

Charakterisierung von Struktur und Funktionsmechanismus des  
Organo-Anionen-Transporters 2B1 (OATP2B1) mittels Förster-Resonanzenergietransfers

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Paul Hagen

Greifswald, 30.07.2018

Dekan: Prof. Dr. Werner Weitschies

1. Gutachter: Prof. Dr. Werner Siegmund

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Freissmuth

Tag der Promotion: 17.12.2018

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Diagrammverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
Physikalische und biologische Formelzeichen und Einheiten	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Die Rolle von Transportproteinen im menschlichen Körper	1
1.2 <i>Organic anion-transporting polypeptides</i> (OATPs)	3
1.2.1 Bedeutung der OATPs für den Menschen	4
1.2.2 Von der OATP-Struktur zum Transportmechanismus	6
1.2.3 Methoden zur Untersuchung der Transporteraktivität	9
1.3 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	12
1.3.1 Grundlagen	12
1.3.2 Praktische Anwendung	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.2 Methoden	17
2.2.1 Grundlegende molekularbiologische Methoden	17
2.2.1.1 Klonierung	17
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion	17
2.2.1.3 Gezielte Mutagenese	18
2.2.1.4 Restriktionsverdau	19
2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	19

2.2.1.6	Präparative DNA-Aufreinigung	20
2.2.1.7	Ligation	20
2.2.1.8	Transformation kompetenter Zellen	20
2.2.1.9	Selektion positiver Klone	21
2.2.1.10	Präparative Plasmid-Isolation	21
2.2.1.11	Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren	21
2.2.1.12	Sequenzierung	21
2.2.2	Spezielle molekularbiologische Methoden	22
2.2.2.1	Generierung des <i>OATP2B1-ECFP</i> -Fusionsvektors	22
2.2.2.2	Generierung der <i>EYFP-OATP2B1-ECFP</i> -Fusionsvektoren	22
2.2.2.3	Generierung der <i>FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> -Mutanten	23
2.2.2.4	Generierung der FIAsH-Kontrollvektoren	24
2.2.3	Zellbiologische Methoden	24
2.2.3.1	Kultivierung von Zellen	24
2.2.3.2	Kryokonservierung von Zellen	24
2.2.3.3	Zellzahlbestimmung	25
2.2.3.4	Aussaat von Zellen	25
2.2.3.5	Transfektion von Zellen	25
2.2.3.6	Herstellung stabil transfizierter Zelllinien	25
2.2.3.7	Proteinmarkierung mit FIAsH-EDT <sub>2</sub>	26
2.2.4	Proteinanalytische Methoden	26
2.2.4.1	Isolation des Gesamtproteins	26
2.2.4.2	Isolation der Membranproteinfraktion	27
2.2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
2.2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.2.4.5	Western Blot	28

2.2.5	Transporterassay	29
2.2.6	Mikroskopische Methoden	29
2.2.6.1	Fluoreszenzmikroskopie	29
2.2.6.2	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	29
2.3	Generierung und Darstellung von 3D-Strukturmodellen	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Generierung von FRET-Fusionsvektoren	33
3.1.1	<i>EYFP-OATP2B1-ECFP</i> -Vektoren	35
3.1.2	<i>FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> -Vektoren	37
3.1.3	FIAsH-Kontrollvektoren	38
3.2	Etablierung der FRET-Messungen	39
3.2.1	Zellmodell und Transfektionsbedingungen	39
3.2.2	Etablierung der FRET-Messung via <i>photobleaching</i>	40
3.2.3	Etablierung der FRET-Messung via <i>sensitized emission</i>	44
3.3	Charakterisierung der <i>EYFP-OATP2B1-ECFP</i> -Fusionsproteine	45
3.3.1	Lokalisation	45
3.3.2	Funktion	48
3.3.3	FRET-Effizienz	48
3.3.4	<i>In silico</i> -Analyse	53
3.4	Charakterisierung der <i>FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> -Fusionsproteine	57
3.4.1	Lokalisation	57
3.4.2	Funktion	59
3.4.3	FRET-Effizienz	60
3.4.4	<i>In silico</i> -Analyse	64
3.5	Etablierung und Charakterisierung einer <i>S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> -stabil-exprimierenden Zelllinie	68
3.5.1	Lokalisation	68

3.5.2	Funktion	69
3.5.3	FRET-Effizienz	72
3.5.4	<i>In silico</i> -Analyse	74
4	Diskussion	76
4.1	Bewertung der etablierten FRET-Methoden	76
4.2	Charakterisierung der OATP2B1-Fusionsproteine	79
4.2.1	Herstellung der OATP2B1-Fusionsproteine	79
4.2.2	Lokalisation und Funktion der OATP2B1-Fusionsproteine	81
4.2.3	FRET-Effizienz der OATP2B1-Fusionsproteine	83
4.3	FRET zur Testung der Transportaktivität	88
4.4	Limitationen	93
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	97
	Eigenständigkeitserklärung	107
	Lebenslauf	108
	Anhang	110
	Material	110
	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	110
	Chemikalien und kommerzielle Kits	114
	Gebrauchsfertige Lösungen und Medien	117
	Enzyme	119
	Plasmidvektoren	120
	Oligonukleotide	120
	Antikörper	122
	Zelllinien und Bakterienstämme	122
	Software	122

Vektorkarten	124
pJET1.2/blunt	124
pcDNA™3.1/Hygro <sup>(-)</sup>	124
pECFP-C1	125
pECFP-N1	125
pEYFP-C1	126
pEYFP-N1	126
Sequenzierungen	127
OATP2B1-ECFP	127
EZS2-FIAsh-OATP2B1-ECFP	134
S2-FIAsh-OATP2B1-ECFP	134
S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP	134
S4-FIAsh-OATP2B1-ECFP	134
EZS5-FIAsh-OATP2B1-ECFP	135
S5-FIAsh-OATP2B1-ECFP	135

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausgewählte Gewebeverteilung von OATP1A2, 1B1, 1B3 und 2B1.	4
Abbildung 2: Prognostizierte Strukturen der OATPs.	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des <i>Rocker-switch</i> -Mechanismus für die OATPs.	9
Abbildung 4: Darstellung der Mechanismen einzelner Transporterassays.	11
Abbildung 5: Vereinfachtes Jabłoński-Schema des FRET-Mechanismus.	12
Abbildung 6: Grundlagen des Förster-Resonanzenergietransfers.	13
Abbildung 7: <i>Rocker-switch</i> -Mechanismus mit modifiziertem Transporter.	15
Abbildung 8: Übersicht eines Klonierungsprozesses	17
Abbildung 9: Vorgänge beim <i>photobleaching</i> .	30
Abbildung 10: Lokalisation des <i>OATP2B1-ECFP</i> in HeLa-Zellen.	34
Abbildung 11: Simuliertes 3D-Proteinmodell vom Wildtyp-OATP2B1 und <i>OATP2B1-ECFP</i> .	35
Abbildung 12: Sekundärstruktur des <i>OATP2B1-ECFP</i> mit den Integrationsstellen für EYFP.	36
Abbildung 13: Restriktionsverdau der hergestellten <i>EYFP-OATP2B1-ECFP</i> -Vektoren.	37
Abbildung 14: Sekundärstruktur <i>OATP2B1-ECFP</i> mit Mutagenesestellen für das TC-Motiv.	38
Abbildung 15: Expression der FIAsh-Kontrollvektoren in HeLa-Zellen.	39
Abbildung 16: <i>Photobleaching</i> der <i>ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle</i> in einer HeLa-Zelle.	41
Abbildung 17: <i>Sensitized emission</i> am Beispiel der <i>ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle</i> .	45
Abbildung 18: Lokalisation des <i>S1-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	46
Abbildung 19: Lokalisation des <i>S2-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	46
Abbildung 20: Lokalisation des <i>S3-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	46
Abbildung 21: Lokalisation des <i>S4-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	47
Abbildung 22: Lokalisation des <i>S5-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	47
Abbildung 23: Lokalisation des <i>EZS2-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	47
Abbildung 24: 3D-Modell von <i>EZS2-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> .	57
Abbildung 25: Lokalisation des <i>S2-FIAsh-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	58
Abbildung 26: Lokalisation des <i>S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	58
Abbildung 27: Lokalisation des <i>S4-FIAsh-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	58
Abbildung 28: Lokalisation des <i>S5-FIAsh-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	59
Abbildung 29: Lokalisation des <i>EZS2-FIAsh-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	59
Abbildung 30: Lokalisation des <i>EZS5-FIAsh-OATP2B1-ECFP</i> in MDCKII-Zellen.	59
Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahme des <i>S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP</i> -Stabiltransfektanten.	68



Abbildung 32: Lokalisation <i>S3-FAsH-OATP2B1-ECFP</i> in stabil transfizierten MDCKII-Zellen.	69
Abbildung 33: Western-Blot des <i>S3-FAsH-OATP2B1-ECFP</i> -Stabiltransfektanten.	69
Abbildung 34: Aufnahme des Stabiltransfektanten mittels <i>sensitized emission</i> .	74

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches	18
Tabelle 2: Temperatur-Zeit-Profil des Thermalcyclers	18
Tabelle 3: Zusammensetzung des Restriktionsreaktionsgemisches	19
Tabelle 4: Zusammensetzung des Ligationsreaktionsgemisches	20
Tabelle 5: Mutagenese-Reaktionsgemisch ( <i>EYFP</i> - bzw. <i>FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> )	23
Tabelle 6: Temperatur-Zeit-Profil ( <i>EYFP-OATP2B1-ECFP</i> bzw. <i>FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> )	23
Tabelle 7: Zusammensetzung des Sammelgels	28
Tabelle 8: Zusammensetzung des Trenngels	28
Tabelle 9: Fluorochrome mit ihren Parametern	29
Tabelle 10: Mutagenesestellen zur Integration des <i>EYFP</i> in das <i>OATP2B1-ECFP</i> .	36
Tabelle 11: Mutagenesestellen zur Integration des TC-Motivs in das <i>OATP2B1-ECFP</i> .	37
Tabelle 12: Berechnete und gemessene Distanzen nach FRET-Paar und Position.	85
Tabelle 13: Gemessene und berechnete Parameter nach Substanzgabe ( <i>EYFP</i> -Konstrukte).	89
Tabelle 14: Gemessene und berechnete Parameter nach Substanzgabe ( <i>FIAsH</i> -Konstrukte)	89

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Darstellung der Transportaktivität des <i>OATP2B1-ECFP</i> .	34
Diagramm 2: <i>Photobleaching</i> der FRET-Positivkontrolle in Abhängigkeit zu den <i>iterations</i> .	42
Diagramm 3: Prozentualer Verlauf beim Bleichen der FRET-Positivkontrolle.	42
Diagramm 4: FRET-Effizienzen der FRET-Kontrollvektoren nach Akzeptor- <i>photobleaching</i> .	43
Diagramm 5: FRET-Effizienzen der <i>ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle</i> unter Substanzgabe.	43
Diagramm 6: FRET-Effizienzen (N-FRET) der ECFP/EYFP-FRET-Kontrollvektoren.	44
Diagramm 7: Darstellung der Transportaktivität der <i>EYFP-OATP2B1-ECFP</i> -Fusionsproteine.	48
Diagramm 8: FRET-Effizienzen der <i>EYFP-OATP2B1-ECFP</i> -Fusionsproteine nach Position.	49
Diagramm 9: FRET-Effizienz <i>S1-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> unter Substanzgabe.	50
Diagramm 10: FRET-Effizienz <i>S2-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> unter Substanzgabe.	50
Diagramm 11: FRET-Effizienz <i>S3-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> unter Substanzgabe.	51
Diagramm 12: FRET-Effizienz <i>S4-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> unter Substanzgabe.	52
Diagramm 13: FRET-Effizienz <i>S5-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> unter Substanzgabe.	52
Diagramm 14: Spektren von ECFP und EYFP mit Überlappungsbereich für $J(\lambda)$ .	53
Diagramm 15: Abstandsberechnung <i>S1-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	54
Diagramm 16: Abstandsberechnung <i>S2-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	55
Diagramm 17: Abstandsberechnung <i>S3-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	55
Diagramm 18: Abstandsberechnung <i>S4-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	56
Diagramm 19: Abstandsberechnung <i>S5-EYFP-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	56
Diagramm 20: Transportaktivität der <i>FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> -Fusionsproteine.	60
Diagramm 21: FRET-Effizienzen der <i>FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> -Fusionsproteine nach Position.	61
Diagramm 22: FRET-Effizienz <i>S2-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> unter Substanzgabe.	62
Diagramm 23: FRET-Effizienz <i>S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> unter Substanzgabe.	62
Diagramm 24: FRET-Effizienz <i>S4-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> unter Substanzgabe.	63
Diagramm 25: FRET-Effizienz <i>S5-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> unter Substanzgabe.	63
Diagramm 26: Spektren von ECFP und FIAsH mit Überlappungsbereich für $J(\lambda)$ .	64
Diagramm 27: Abstandsberechnung <i>S2-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	65
Diagramm 28: Abstandsberechnung <i>S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	65
Diagramm 29: Abstandsberechnung <i>S4-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	66
Diagramm 30: Abstandsberechnung <i>S5-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	66
Diagramm 31: Abstandsberechnung <i>EZS2-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	67

Diagramm 32: Abstandsberechnung <i>EZS5-FlAsH-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	67
Diagramm 33: Darstellung der Transportaktivität des <i>S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP</i> .	70
Diagramm 34: Bestimmung des <i>K<sub>m</sub></i> für E <sub>1</sub> S.	71
Diagramm 35: Bestimmung des <i>K<sub>m</sub></i> für Atorvastatin.	71
Diagramm 36: Bestimmung der <i>IC<sub>50</sub></i> für Atorvastatin.	72
Diagramm 37: <i>photobleaching</i> des stabil transfizierten <i>S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP</i> .	73
Diagramm 38: <i>sensitized emission</i> des stabil transfizierten <i>S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP</i> .	73
Diagramm 39: Abstandsberechnung <i>S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP</i> sowie dessen 3D-Modell.	75

## Abkürzungsverzeichnis

· XH <sub>2</sub> O	Hydrat
A	Adenin
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CYP	Cytochrom P450
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
E <sub>1</sub> S	Estron-3-sulfat
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
Em.	Emission
Ex.	<i>Excitation</i> (engl. Anregung)
et al.	<i>et alii</i> ; und andere
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
F	<i>forward</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FIAsH-EDT <sub>2</sub>	<i>fluorescein arsenical hairpin binder-ethanedithiol</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HMM	<i>Hidden Markow Model</i>
IP	Inkubationspuffer
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Konfidenzintervall (95 %)
Konz.	Konzentration
LB	<i>lysogeny broth</i>
MALDI-TOF	Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung- <i>time of flight</i> , engl. Flugzeitanalyse
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDCKII	<i>Madin Darby canine kidney II</i>
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
P-gp	<i>permeability glycoprotein</i> , P-Glykoprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
R	<i>reverse</i>
ROI	<i>region of interest</i> ; Messbereich
RT	Raumtemperatur (20 °C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	<i>solute carrier</i>
smFRET	<i>single molecule</i> -FRET
T	Thymin
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TC	Tetracystein

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
zzgl.	zuzüglich

## Physikalische und biologische Formelzeichen und Einheiten

%	Prozent
$E_{FRET}$	FRET-Effizienz
$IC_{50}$	mittlere inhibitorische Konzentration
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
$R_0$	Förster-Radius
$r_{D-A}$	Abstand zwischen FRET-Donor und -Akzeptor
$\kappa^2$	Orientierungsfaktor
$\times g$	mal Schwerebeschleunigung
°C	Grad Celsius
$\mu$ -	Mikro-(Einheit) (Millionstel; $10^{-6}$ )
A	Ampere
Å	Ångström
AU	airy unit
b	Base
bp	Basenpaare
c	Stoffmengenkonzentration
c-	Zenti-(Einheit) (Hundertstel; $10^{-2}$ )
Ci	Curie
Da	Dalton
f-	Femto-(Einheit) (Billiardstel; $10^{-15}$ )
g	Gramm
h	Stunde
$J$	Integral der Spektrenüberlappung von Donor und Akzeptor
k-	Kilo-(Einheit) (Tausendfaches; $10^3$ )
L	Liter
log	Logarithmus
m	Meter
M	Molar
m-	Milli-(Einheit) (Tausendstel; $10^{-3}$ )
min	Minute
n-	Nano-(Einheit) (Milliardstel; $10^{-9}$ )
p-	Piko-(Einheit) (Billionstel; $10^{-12}$ )
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> ( $-\log_{10}$ der Wasserstoffionenaktivität)



rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
t	Zeit
U	Enzymeinheit
V	Volt

# 1 Einleitung

Transportproteine übernehmen in menschlichen und tierischen, aber auch in bakteriellen und pflanzlichen Organismen eine wichtige Rolle bei der Disposition von endogenen sowie exogenen Substanzen. Insbesondere ihr Einfluss auf die Pharmakotherapie hat sie in den vergangenen Jahren in den Fokus der medizinischen und pharmazeutischen Forschung treten lassen.

## 1.1 Die Rolle von Transportproteinen im menschlichen Körper

Die Existenz von Zellen und ihre Kompartimentierung wären ohne Biomembranen nicht denkbar. Diese ermöglichen zunächst die Abgrenzung der Zelle von ihrer Umwelt und bilden zugleich die Grundlage für einen gerichteten Transport zahlreicher Moleküle, die zum Überleben notwendig sind. Vor allem für große und polare Moleküle stellt die Biomembran ein kaum zu überwindendes Hindernis dar. Hierunter fallen auch Substanzen wie Glucose, von der allein ein *E. coli*-Bakterium rund  $10^6$  Moleküle pro Sekunde für sein Wachstum benötigt (Svoboda et al. 2011). Im Laufe der Evolution kam es jedoch zur Einlagerung von Transmembranproteinen (Davidson et al. 2008; Saier 2003). Diese ermöglichen die Passage von Stoffen, welche durch Diffusion allein nicht ins Zellinnere gelangen könnten. Dadurch war auch die Entwicklung höherer Organismen möglich, deren Stoffwechsel einen schnellen und umfassenden Stoffaustausch zwischen einer Vielzahl an Zellen voraussetzt (Nielsen 2008; Rees et al. 2009). Die einfachste Form dieser Transmembranproteine stellen Ionenkanäle dar (Nayak et al. 2009; Pohorille et al. 2005). Über diese gelangen vor allem kleine anorganische Ionen durch die Zellmembran. Ähnlich verläuft auch der Transport von Wasser mittels Wasserkanälen, den sog. Aquaporinen (Agre 2006). Derartige Kanalproteine übernehmen aber nur einen kleinen Teil des wachsenden Spektrums an Substanzen ( $> 131$  Mio. nach CAS REGISTRY<sup>SM</sup>), die dem Menschen in seiner Umwelt begegnen und die er über Nahrung und Arzneimittel aufnimmt. Der weitaus größte Anteil des Membrantransports kommt den passenderweise als *Carrier*, zu Deutsch Transporter, bezeichneten Proteine zu (Higgins 1992). Hier sind insbesondere die Superfamilien der SLC- (*Solute Carrier*) und ABC-Transporter (*ATP binding cassette*) zu nennen (You und Morris 2007). Vertreter beider Familien vermitteln nicht nur den Transport einer ganzen Reihe endogener Substanzen, sondern auch zahlreicher Xenobiotika und Wirkstoffe. Damit haben sie Anteil an allen Prozessen, denen ein Pharmakon nach seiner Applikation im

Körper ausgesetzt ist. Dies reicht von der Absorption im Magen-Darm-Trakt, über die Verteilung in andere Kompartimente, bis hin zu der Metabolisierung und letztendlich auch der Ausscheidung des Pharmakons. Wie genau der jeweilige Transporter dabei seinen Einfluss ausübt, hängt im Wesentlichen davon ab, ob er das Substrat aus oder in die Zelle bzw. ein Zellkompartiment schleust und wie er in der Zelle lokalisiert ist (Petzinger und Geyer 2006). In den Zellmembranen von Eukaryoten bislang ausschließlich als Auswärtstransporter beobachtet sind die ABC-Transporter. Ihr pharmakologisch wahrscheinlich bekanntester Vertreter ist das P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1). Die Bezeichnung ist dabei auf seine Entdeckung zurückzuführen, als man ein bislang unbekanntes Oberflächenglykoprotein für die veränderte Permeabilität von CHO-Zellen für verschiedene Arzneistoffe verantwortlich machte (Juliano und Ling 1976). Heute weiß man, dass nicht die Permeabilität betroffen ist, sondern es zum Efflux der Substanzen aus dem Zytosol kommt. Die physiologische Bedeutung vom P-gp wird insbesondere deutlich durch seine Lokalisation in Geweben, die eine Barrierefunktion besitzen (Blut-Hirnschranke, Plazenta) oder an der Absorption bzw. Exkretion von Stoffen beteiligt sind (Dünndarm, Leber, Niere). Dadurch sorgt es einerseits dafür, dass potenziell toxische Substanzen gar nicht erst in das entsprechende Kompartiment gelangen und andererseits dafür, dass Metabolite aktiv ausgeschleust und in entsprechende Ausscheidungsprodukte (Galle, Urin) eliminiert werden (Fromm 2004; Thiebaut et al. 1987). Zum Nachteil therapeutischer Ziele wird P-gp aber auch von bestimmten Krebszellarten exprimiert (Fojo et al. 1987). Dadurch erhalten diese eine Resistenz gegen eine Reihe von antineoplastischen Arzneistoffen (z.B. Vincristin, Paclitaxel). Diese Resistenz führte zur heute ebenfalls gebräuchlichen Bezeichnung *multidrug resistance protein 1* (MDR1) für P-gp. Aber auch die Pharmakokinetik von Arzneistoffen wie z.B. Digoxin oder Saquinavir ist durch das P-gp beeinflusst (Szakács et al. 2008). Nachteilig für den Therapieerfolg wird dieser Einfluss vor allem dann, wenn die Bioverfügbarkeit durch Induktion des P-gps herabgesetzt wird. Bekannte Induktoren sind bspw. Rifampicin und zahlreiche Flavonoide (Alvarez et al. 2010; Greiner et al. 1999). Auf der anderen Seite führt eine Inhibition von P-gp zu einem Anstieg der Bioverfügbarkeit seiner Substrate (Pedersen et al. 1983). Dies kann sich anhand einer erhöhten Rate von unerwünschten Arzneimittelwirkungen äußern. Aber auch die gezielte Inhibition zur Verbesserung des Therapieerfolgs wird praktiziert (Amin 2013). Geläufige Inhibitoren sind unter anderem Clarithromycin, Chinidin und Verapamil (Hughes und Crowe 2010; Yasui-Furukori et al. 2005). Folge dieser Entdeckungen ist die Forderung von EMA und FDA neue Arzneistoffe hinsichtlich ihres Status als Inhibitor,

Induktor bzw. Substrat von P-gp zu untersuchen. Neben P-gp und den ABC-Transportern BCRP und BSEP gilt diese Forderung auch für eine ganze Reihe von SLC-Transportern (European Medicines Agency 2012; U.S. Food and Drug Administration 2012).

Im Gegensatz zu ABC-Transportern erfolgt der Transport durch SLC-Transporter ATP-unabhängig und ist in beide Richtungen möglich, obwohl sie gemeinhin als Aufnahmetransporter beschrieben werden. Substrate können sowohl ungeladen als auch geladen sein. Treibende Kraft hierbei kann wie auch bei den meisten Kanalproteinen ein elektrochemischer Gradient sein (erleichterte Diffusion). Beschrieben ist außerdem ein Antiport des Substrats mit einem gleichgeladenen Teilchen zur Wahrung der elektrochemischen Neutralität. Diese kann andererseits auch durch den Symport von geladenen Teilchen erhalten bleiben (Hediger et al. 2004). Die pharmakologisch bedeutsamsten und deshalb auch von EMA und FDA berücksichtigen SLC-Transporter sind in den Familien SLCO (SLC21A) und SLC22A zu finden. Namentlich sind dies die *Organic anion-transporting polypeptides 1B1* und *1B3* (OATP1B1/1B3; SLCO1B1/1B3), die *Organic cation transport proteins 1* und *2* (OCT1/2; SLC22A1/2) sowie die *Organic anion transport proteins 1* und *3* (OAT1/3; SLC22A6/8). Die Bezeichnungen der Proteine lassen dabei bereits auf das Substratspektrum schließen, wobei die OATPs vor allem große, hydrophobe organische Anionen und die OATs kleinere, eher hydrophile organische Anionen transportieren. Bedeutsame Arzneistoffe, die in ihr Substratspektrum fallen und meist keinerlei Strukturverwandtschaft zeigen, sind u. a. Statine, Antiviralia, Antibiotika und Zytostatika (Roth et al. 2012). Ähnlich wie P-gp haben sie aufgrund ihrer Lokalisation in Geweben, die an der Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung beteiligt sind, Einfluss auf die Pharmakokinetik dieser Substanzen. Aufgrund ihrer gestiegenen Bedeutung sind sie nach wie vor Gegenstand pharmakologischer Forschung. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf dem Screening potenzieller Interaktionspartner, ihrer Lokalisation, ihrer Struktur sowie dem noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus des Transportvorgangs. Im Weiteren soll dies für die OATPs näher erläutert werden.

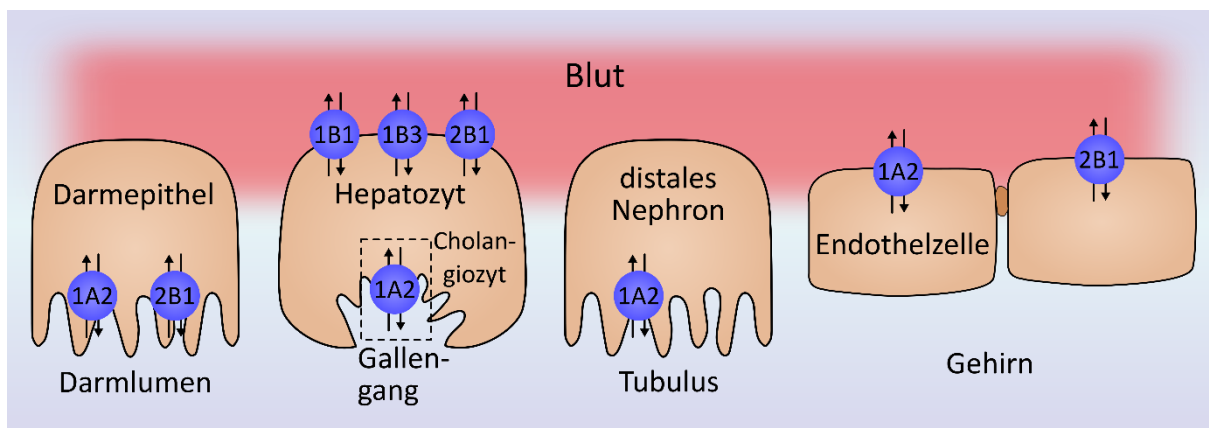
## **1.2 *Organic anion-transporting polypeptides* (OATPs)**

Beim Menschen sind elf Vertreter der OATP-Familie identifiziert worden. Diese gliedern sich nicht nur beim Menschen in die Familien 1 – 6 und Subfamilien A bis C. Die Klassifizierung beruht dabei auf der Sequenzhomologie der Aminosäuren der einzelnen Vertreter. Dabei wird die Zugehörigkeit zu einer Familie bei einer Homologie zwischen 40 und 60 % festgelegt, die zu einer Subfamilie bei über 60 %. Innerhalb der Subfamilien werden die Vertreter nach der

Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert. Die Proteinnomenklatur der OATPs hatte zur Folge, dass die Genbezeichnung von ehemals SLC21A zu SLCO (für *Organic*) geändert wurde. Dadurch unterbleibt die Bezeichnung für bspw. OATP1A2 als SLC211A2, was zukünftig zu Verwechslungen mit der zumindest hypothetischen SLC211-Familie führen könnte. (Hagenbuch und Meier 2004). Pharmakologisch am besten charakterisiert sind neben den bereits behördlich berücksichtigten OATP1B1 und OATP1B3 auch OATP1A2 sowie OATP2B1 (Kalliokoski und Niemi 2009).

### 1.2.1 Bedeutung der OATPs für den Menschen

Die OATPs wurden in zahlreichen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen (vgl. Abbildung 1). Von den genannten vier Vertretern sind alle in der Leber zu finden: 1B1, 1B3 und 2B1 sind in der basolateralen Membran der Hepatozyten lokalisiert, 1A2 in den Cholangiozyten, welche die Gallenwege bilden (Abe et al. 1999; Hsiang et al. 1999; König et al. 2000a, 2000b; Kullak-Ublick et al. 1995; Kullak-Ublick et al. 2001; Lee et al. 2005). Im Darm befinden sich 1A2 (allerdings angezweifelt) sowie 2B1 (Glaeser et al. 2007; Kobayashi et al. 2003). Beide sind weiterhin im Endothel der Hirnkapillaren exprimiert und haben somit Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke (Bronger et al. 2005). Außerdem ist OATP1A2 in der apikalen Membran der Epithelzellen des distalen Tubulus von Nephronen zu finden (Lee et al. 2005).



**Abbildung 1: Ausgewählte Gewebeverteilung von OATP1A2, 1B1, 1B3 und 2B1.** Die Zellpolarität bestimmt die intrazelluläre Lokalisation der OATPs. Sie vermitteln deshalb sowohl den Transport zwischen den Kompartimenten Blut/Gewebe als auch Lumen/Gewebe. Modifiziert nach (Roth et al. 2012).

Durch ihre Lokalisation in bestimmten Organen sind sie daran beteiligt, die pharmakokinetischen Größen ihrer Substrate zu determinieren. Endogene Substrate von OATP1B1 sind u. a. Gallensalze wie Bilirubinglucuronid und konjugierte Steroide wie Estron-3-sulfat oder 17 $\beta$ -Estradiol-3-glucuronid, aber auch Schilddrüsenhormone (Abe et al. 1999; Cui et al. 2001; Kanai et

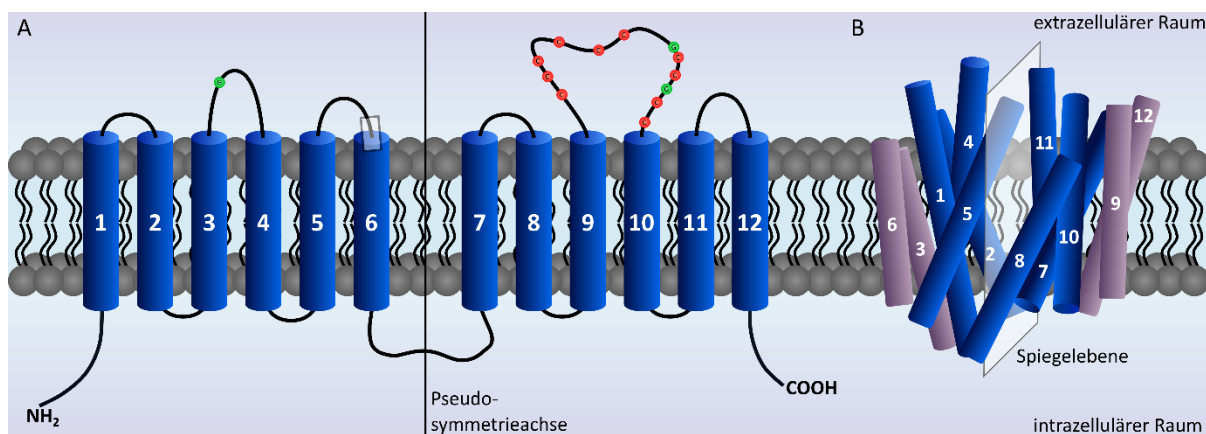
al. 1996; Tamai et al. 2000; van der Deure et al. 2008). Ausgewählte Arzneistoffe, deren Transport OATP1B1 vermittelt, sind eine Reihe von Statinen wie Atorvastatin und Simvastatin, ACE-Hemmer wie Enalapril sowie AT<sub>1</sub>-Antagonisten wie Olmesartan (Kameyama et al. 2005; Liu et al. 2006; Nakagomi-Hagihara et al. 2006). Auch für OATP1A2, 1B3 und 2B1 sind konjugierte Steroide als endogene Substrate identifiziert worden, für 1A2 und 1B3 daneben ebenfalls Gallensalze (Bossuyt et al. 1996; König et al. 2000b; Kullak-Ublick et al. 1995; Kullak-Ublick et al. 1998; Kullak-Ublick et al. 2000; Kullak-Ublick et al. 2001). Diese Überlappung setzt sich teilweise auch beim Spektrum der transportierten Arzneistoffe fort. So konnten für 1B3 ebenfalls Statine, ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Antagonisten als Substrate identifiziert werden, die Statine darüber hinaus auch für OATP2B1 (Grube et al. 2006; Kopplow et al. 2005; Liu et al. 2006; Nozawa et al. 2004; Yamashiro et al. 2006). Für OATP1A2 wurden ebenso Statine als Substrate nachgewiesen, daneben aber auch Antibiotika wie Levofloxacin und das antiviral wirksame Saquinavir (Ho et al. 2006; Maeda et al. 2007; Su et al. 2004). Bei diesem breiten Substratspektrum ist anzunehmen, dass auch bei den OATPs zahlreiche Arzneimittelinteraktionen auftreten können. So konnten für zahlreiche Substanzen inhibitorische Effekte auf die OATPs nachgewiesen werden. Abhängig von der Lokalisation der OATPs kann dies dazu führen, dass entweder die Absorption ihrer Substrate im Darm vermindert wird oder aber die Aufnahme in die metabolisierenden Hepatozyten. Als Folge dessen kann eine Zu- bzw. Abnahme der Bioverfügbarkeit auftreten (Koenen et al. 2011). Ein Inhibitor, für den ein Effekt auf alle der genannten OATPs gezeigt wurde, ist dabei Rifampicin (Annaert et al. 2010; Ho et al. 2006; Letschert et al. 2006; Vavricka et al. 2002; Zheng et al. 2009). Da Rifampicin auch als Induktor von bspw. P-gp und zahlreichen Cytochrom P450-Enzymen wie CYP3A4 agiert, sind *in vivo* auftretende Einflüsse hinsichtlich der verschiedenen Proteine deutlich voneinander zu differenzieren (Backman et al. 2005; Zheng et al. 2009). Analog zu der PXR-vermittelten Induktion von P-gp oder den CYPs durch Rifampicin konnte dies *in vitro* auch, zwar schwächer, für OATP1B1 und 1A2 nachgewiesen werden (Meyer zu Schwabedissen et al. 2008; Williamson et al. 2013). Eine Evidenz für eine klinische Relevanz der Induktion von OATPs ist allerdings kaum gegeben. Daher sind Vorhersagen aufgrund der vielschichtigen Beziehungen von Induktoren, die oft auch Inhibitoren oder Substrate sind, nicht trivial (Svoboda et al. 2011).

Ein weiterer Aspekt, der auch bei den OATPs von Interesse sein kann, ist die Pharmakogenetik. So konnten bspw. für OATP1B1, 1A2 und 2B1 genetische Polymorphismen identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Pharmakokinetik ihrer Substrate haben. Bei 1B1 verursacht die

Allel-Variante N130D eine veränderte Kinetik von Pravastatin (Mwinyi et al. 2004; Nishizato 2003). Beim OATP1A2 konnte ein Zusammenhang zwischen der Clearance von Imatinib und den verschiedenen SLCO1A2-Allelen nachgewiesen werden (Yamakawa et al. 2011). Weiterhin zeigte sich für das OATP2B1 eine vom Genotyp abhängige Kinetik und scheinbare Selektivität für das Enantiomer S-Fexofenadin (Akamine et al. 2010).

### 1.2.2 Von der OATP-Struktur zum Transportmechanismus

Obwohl die Bedeutung der OATPs für pharmakologische Fragestellungen unbestritten ist, konnte ihr genauer Funktionsmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Auf dem Weg dahin wurde in der Vergangenheit vor allem ihre Struktur genauer untersucht. Diese diente als Grundlage für die Erfassung von konservierten Bereichen innerhalb der Familie, der Ermittlung ihrer physikochemischen Eigenschaften sowie Identifizierung von potenziellen funktionellen Einheiten innerhalb der Proteine.



**Abbildung 2: Prognostizierte Strukturen der OATPs. (A)** Sekundärstruktur mit zwölf Transmembrandomänen (■), sechs extrazellulären Schleifen und fünf intrazellulären Schleifen. Charakteristische Merkmale sind außerdem die Glykosylierungsstellen (●) und die Cysteine (●) sowie die Signatursequenz (Rahmen an TMD 6). Eine Pseudosymmetrieachse trennt die sechs N-terminalen und sechs C-terminalen TMD. Nach (Obaidat et al. 2012) **(B)** Darstellung der räumlichen Struktur der OATPs anhand der TMD. Eine gedachte Spiegelebene trennt die N- von den C-terminalen TMD. Jeweils vier TMD bilden die zentrale Pore (blau), die übrigen sind nur in der Membran verankert (blass violett). Nach (Meier-Abt et al. 2005)

Strukturell gemein ist allen humanen OATPs, die mit einer Ausnahme aus 643 – 724 Aminosäuren bestehen, die Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TMD). Auf Grundlage der Hydrophobizität von Aminosäuren in Proteinen wurden hier 10 oder 12 TMD vorhergesagt. Experimentell konnten für Oatp1a1 (Ratte) 12 TMD nachgewiesen werden (Wang et al. 2008). Deshalb umfasst auch das für die humanen Vertreter postulierte sekundäre Strukturmodell letztlich 12 TMD mit 5 intrazellulären (IZS) und 6 extrazellulären Schleifen (EZS) (vgl. Abbildung 2A). Außerdem sind der N- und der C-Terminus des Proteins intrazellulär gelegen (Klein et al. 1985; Kullak-Ublick et al. 1995). Diese angenommene Sekundärstruktur konnte bislang allerdings

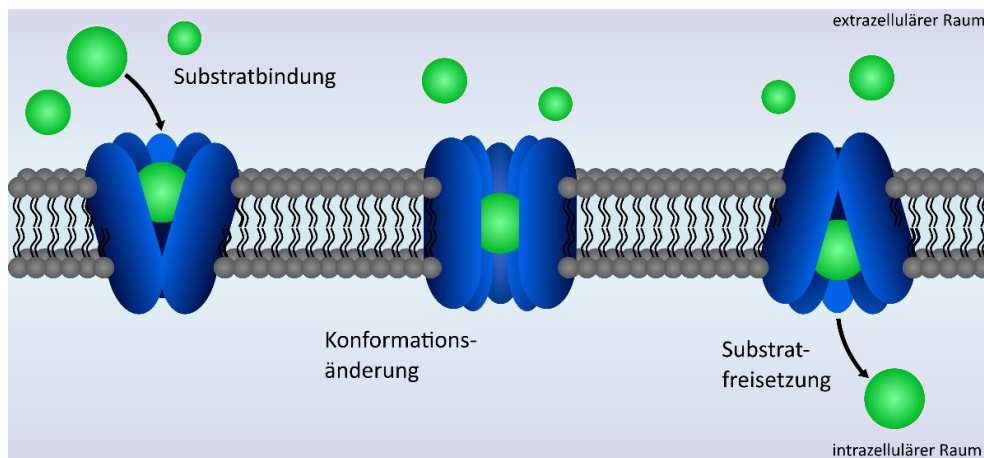
noch nicht durch Kristallstrukturanalysen bestätigt werden, Daten von bakteriellen SLC-Transportern deuten aber darauf hin. Weitere charakteristische Merkmale der OATP-Struktur sind die große 5. EZS zwischen der 9. und 10. TMD, die N-Glykosylierungsstellen in der 2. und 5. EZS sowie eine spezifische Sequenz im Übergang von der 3. EZS zur 6. TMD, die sog. Signatur der OATP-Superfamilie (Hagenbuch und Meier 2003). Die 5. EZS zeichnet sich vor allem durch 10 konservierte Cysteine aus. Für das OATP2B1 konnte durch gezielte Mutagenese dieser Cysteine gezeigt werden, dass sie alle an der Ausbildung von Disulfidbindungen beteiligt sind. Weiterhin führt ihr Austausch zu einer fehlerhaften Prozessierung und einer beeinträchtigten Funktion (Hänggi et al. 2006). Ähnliches wurde anhand des Oatp1a1 (Ratte) für die N-Glykosylierungsstellen in den EZS gezeigt. Auch deren Verlust führt zu einer fehlerhaften Sortierung und/oder einer eingeschränkten Transportfunktion (Lee et al. 2003). Auch die Signatursequenz der OATPs aus 13 Aminosäuren (D-X-RW-(I,V)-GAWW-XG- (F,L)-L) wurde in einen Zusammenhang mit der korrekten Sortierung und Funktion gebracht (Taylor-Wells und Meredith 2014). Neben den extrazellulären Strukturen sind auch einzelne TMD als kritisch für die Transportfunktion identifiziert worden. Sowohl für OATP1B1 als auch 1B3 konnte die 10. TMD als besonders entscheidend für die Transportfunktion beschrieben werden (Gui und Hagenbuch 2008, 2009). Für OATP1B1 konnte dies darüber hinaus auch für die 8. und 9. TMD gezeigt werden (Miyagawa et al. 2009). Hinsichtlich einzelner Aminosäuren lag das Augenmerk auf der Untersuchung der positiv geladenen Aminosäuren in den TMD. Insbesondere die Bedeutung von Lysin und Arginin für die Transportfunktion konnte für OATP1B1 und 1B3 mithilfe gezielter Mutagenesen nachgewiesen werden (Glaeser et al. 2010; Mandery et al. 2011; Weaver und Hagenbuch 2010). Die daraus gewonnenen Erkenntnisse stützen die aus 3D-Modellen für OATP1B3 und 2B1 ermittelte Hypothese, wonach die positiv geladenen Aminosäuren in den TMD die Substratbindestelle und die Pore für dessen Durchlass bilden. Dies geht einher mit dem vornehmlich anionischen Substratspektrum der OATPs (Meier-Abt et al. 2005; Roth et al. 2012).

Die aus den 3D-Modellen für OATP1B3 und 2B1 gewonnenen Daten dienen auch zur Aufstellung einer Theorie hinsichtlich des zugrundeliegenden Transportmechanismus. Ausgangspunkt war hierbei die evolutionäre Zugehörigkeit der OATPs zu den Transportproteinen der *major facilitator superfamily* (MFS) (Meier-Abt et al. 2005). Wie die OATPs setzen sich auch die anderen Vertreter dieser Familie allesamt aus 12 TMD zusammen (Chang et al. 2004). Neben



dieser Gemeinsamkeit wird angenommen, dass alle Vertreter trotz unterschiedlicher Sequenzen eine vergleichbare Struktur ausbilden (Vardy et al. 2004). Dieser Hintergrund und der Umstand, dass für einige Vertreter der MFS bereits Kristallstrukturen existieren, wurde ausgenutzt, um auch für die OATPs einen Funktionsmechanismus abzuleiten. Von großer Bedeutung waren hierbei Befunde zur Struktur der bakteriellen Lactose-Permease und des Glycerol-3-Phosphat-Transporters aus *Escherichia coli*, die auch Ausgangspunkt der aktuellen 3D-Modelle der OATPs waren. Sie zeigen die Proteine mit einer Pseudosymmetrieachse senkrecht zur Membran, anhand derer die 12 TMD um eine zentrale Pore angeordnet sind. Die Symmetrieachse trennt dabei die 6 N-terminalen von den 6 C-terminalen TMD. Die TMD 1, 2, 4 und 5 der N-terminalen sowie die TMD 7, 8, 10 und 11 der C-terminalen Hälfte haben dabei Kontakt zur Pore, wohingegen die anderen weitestgehend in die Membran eingebettet sind (vgl. Abbildung 2B). Die Pore ist dabei zu einer Seite der Membran geöffnet und zu der anderen Seite geschlossen. Ausgehend von dieser Beobachtung wird angenommen, dass die Pore sich nicht nur zu einer Seite hin öffnet, sondern auch zu der anderen. Daraus folgt, dass das Transportprotein während des Transportprozesses zwischen zwei Konformationen wechselt. Dieser Konformationswechsel wird durch die Bindung des Substrats induziert. Es wird vermutet, dass sich in Folge der Bindung des Substrats zwei gegenüberliegende, positiv geladene Aminosäuren nähern. Dies hat zur Folge, dass das gesamte Protein in seiner stabilsten Ausgangskonformation energetisch destabilisiert wird und in einen zweiten wiederum stabilen Konformationszustand übergeht. Dadurch kommt es zur Translokation des Substrats durch die Pore und seinen Übertritt auf die andere Seite der Membran (vgl. Abbildung 3). Durch den Verlust des Substrats nimmt das Protein wieder die energetisch stabilste Konformation ein. Aufgrund der

Art und Weise des Konformationswechsels wird der Mechanismus als *Rocker-switch* (engl. für Wippschalter) bezeichnet (Abramson et al. 2003; Huang et al. 2003; Meier-Abt et al. 2005).



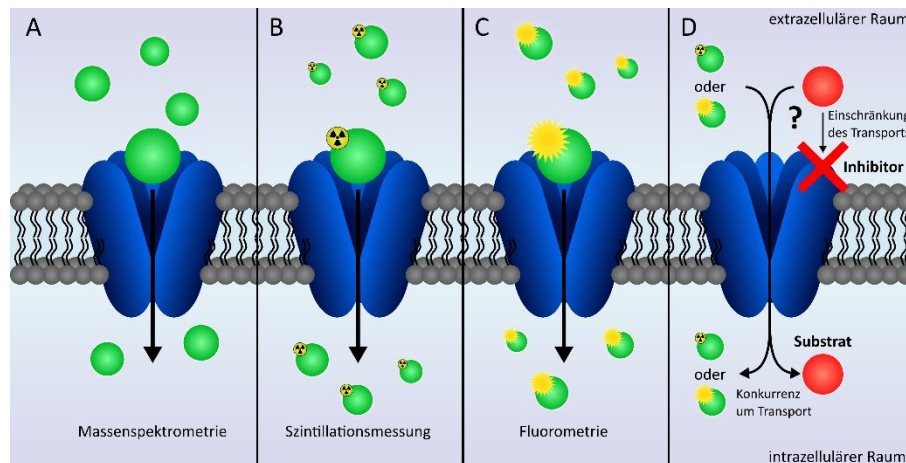
**Abbildung 3: Schematische Darstellung des *Rocker-switch*-Mechanismus für die OATPs.** Im Ausgangszustand liegt der Transporter mit der Substratbindestelle offen in Richtung Extrazellularraum vor. Durch Bindung des Substrats (●) an der Substratbindestelle wird eine Konformationsänderung induziert. Dadurch transloziert das Substrat durch eine sich bildende Pore hinüber auf die andere Seite der Zellmembran. Hier kommt es zur Freisetzung des Substrats in das Zytosol. Anschließend kehrt der Transporter in seine Ausgangskonformation zurück, um das nächste Molekül aufzunehmen.

Nach wie vor nicht vollständig geklärt ist, ob der OATP-vermittelte Transport an den Co-Transport einer weiteren Substanz gebunden ist. Als weitgehend anerkannt gilt, dass der Transport Natrium-, Kalium- sowie Chlorid-unabhängig und ohne Hydrolyse von ATP erfolgt. Da passive Transportprozesse einem elektrochemischen Gradienten folgen, scheint es zumindest wahrscheinlich, dass es auch bei den OATPs direkt oder indirekt zu einem Austausch einer (geladenen) Substanz kommt. Beschrieben ist z.B. ein Grunddurchlass von  $\text{Na}^+$ -Ionen durch den Transporter (Martinez-Becerra et al. 2011). Beobachtet wurde außerdem der Austausch von Bikarbonat, Glutathion oder Glutathionkonjugaten (Li et al. 1998; Li et al. 2000; Satlin et al. 1997). Daneben kann der Transport auch durch den pH-Wert, bedingt durch die Protonierung basischer Aminosäuren, beeinflusst werden (Kobayashi et al. 2003; Leuthold et al. 2009). Allerdings weisen die Ergebnisse teils deutliche Abweichungen innerhalb der OATP-Familie auf, was letztlich in den spezifischen Mechanismen der einzelnen Vertreter begründet liegt (Roth et al. 2012).

### 1.2.3 Methoden zur Untersuchung der Transporteraktivität

Die beschriebenen Erkenntnisse zeigen, dass zur Erforschung der OATPs ein breites Methodenspektrum genutzt wird. Wie bereits erläutert, ist aus pharmakologischen Gesichtspunkten dabei immer das Substratspektrum inklusive möglicher Inhibitoren von besonderem Interesse. Die aktuell zu deren Erfassung genutzten Assays sind funktionell immer an die Analyse

einer transportierten Substanz gebunden. Hierzu kann die Substanz entweder mit einem radioaktiven Tracer (z.B. Tritium) oder einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (z.B. Fluorescein-Methotrexat) und mittels Szintillation oder Fluorometrie erfasst werden (Gui et al. 2010). Daneben ist auch die Verwendung von selbst fluoreszierenden Substraten (z.B. Rhodamin 123) möglich (Forster et al. 2012). Außerdem ist die direkte Messung der Substanzen durch eine entsprechende Analytik (z.B. Massenspektrometrie; MS) gängig. Grundlage für die Untersuchungen sind Zellsysteme, die den zu untersuchenden Transporter überexprimieren und die Substanzen akkumulieren. Ist ein Substrat gefunden, kann sie für den jeweiligen Transporter als Testsubstrat dienen, um mithilfe von Kompetitionsassays andere potenzielle Interaktionspartner zu finden und zu charakterisieren. Inwieweit es sich dabei ebenfalls um ein Substrat handelt oder die Substanz nur als ein Inhibitor fungiert, muss dann wiederum durch eine direkte Messung der Substanz beantwortet werden (vgl. Abbildung 4). Die genannten Methoden weisen allerdings eine ganze Reihe von Nachteilen auf, gerade wenn man sie zum Hochdurchsatz-Screening nutzen möchte. Die Nachteile umfassen für die direkte Messung mittels MS eine teils aufwendige Probenaufbereitung. Außerdem sind für die Analyse der strukturell meist verschiedenen Verbindungen jeweils eigene Protokolle zu etablieren. Im Gegensatz dazu können radioaktiv markierte Substanzen zwar direkt in der Zelle vermessen werden, deren Nutzung bringt jedoch zur Gewährleistung der Arbeitssicherheit sowie der gesetzlichen Bestimmungen erhöhte administrative und sicherheitstechnische Anforderungen mit sich. Des Weiteren sind die Herstellung sowie die Entsorgung der radioaktiven Stoffe mit hohen Kosten verbunden, was sie für ein initiales Hochdurchsatz-Screening wenig geeignet erscheinen lässt. Diese Nachteile bietet die Verwendung fluoreszenzmarkierter Substanzen zwar nicht, es ist aber anzunehmen, dass durch die Einführung großer fluoreszierender Gruppen die Stoffeigenschaften der meisten Substanzen beeinflusst werden. Sie eignen sich deshalb nur für indirekte Verfahren (Kompetitionsassays) mit fluoreszierenden Testsubstraten, die uneingeschränkt transportiert werden.



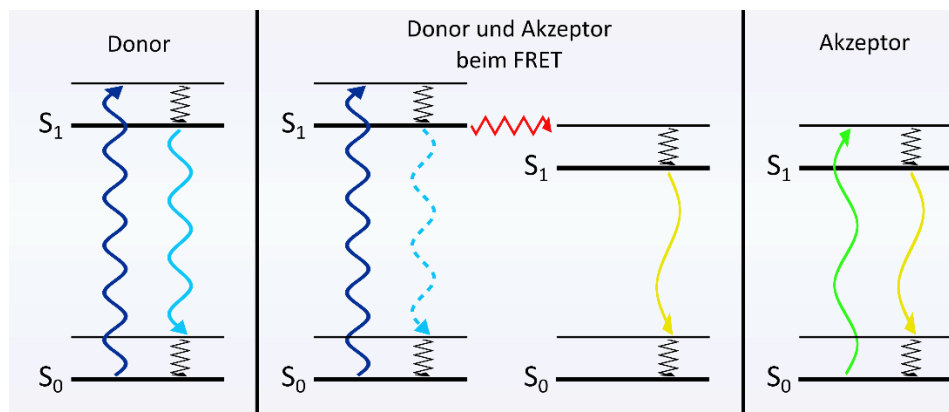
**Abbildung 4: Darstellung der Mechanismen einzelner Transporterassays.** (A) Die den Transporter überexprimierenden Zellen nehmen das Substrat (●) auf. Nach Aufarbeitung der Zellen kann das akkumulierte Substrat über Massenspektrometrie gemessen werden. (B) Mittels des Transporters nehmen die Zellen radioaktiv markiertes Substrat (●) auf. Die Radioaktivität kann anschließend genutzt werden, um einen Szintillator anzuregen und zu vermessen. Über die gemessene Radioaktivität kann auf die aufgenommene Substratmenge rückgeschlossen werden. (C) Ist das Substrat mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert oder fluoresziert selbst (●), kann die aufgenommene Substratmenge direkt über eine fluorometrische Messung bestimmt werden. (D) Beim Kompetitionsassay wird der Einfluss einer unbekannten Substanz (●) auf ein bekanntes Substrat ermittelt. Führt die Substanz zu einer verminderten Aufnahme, ist eine Interaktion der Substanz mit dem Transporter anzunehmen. Ob die Substanz dabei als Inhibitor den Transport einschränkt oder als Substrat um den Transport konkurriert, muss wiederum durch eine der Methoden A – C überprüft werden.

Eine Lösung dieser Problematik wäre nicht länger die transportierten Substanzen oder ihre Tracer zu analysieren, sondern den Transporter bzw. den Transportprozess selbst. Für ABC-Transporter wurde dieser Ansatz bereits umgesetzt und findet in kommerziellen Assays Anwendung. Allerdings erfolgt die Messung dabei indirekt über die ATPase-Aktivität, was für die OATPs nicht möglich ist (Garrigues et al. 2002). Eine auch für die OATPs anwendbare Möglichkeit wäre es sich den beschriebenen Konformationswechsel während des Transportvorganges zunutze zu machen. Grundlage hierfür sind wiederum die Kristallstrukturen der bakteriellen Lactose-Permease. Diese offenbaren Abstände von 10 Å zwischen den TMD und eine Molekülausdehnung von 30 – 60 Å (Abramson et al. 2003). Ein physikalischer Prozess, der in diesen Abständen ablaufen kann, ist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Dieser wurde bereits genutzt, um die substratinduzierten Konformationswechsel der Lactose-Permease zu untersuchen (Majumdar et al. 2007). Daher wäre eine Übertragung der Methode auf die OATPs aufgrund der strukturellen Verwandtschaft naheliegend. Damit könnte die Grundlage für eine alternative Methode zur Messung der OATP-Transporteraktivität geschaffen werden.

## 1.3 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

### 1.3.1 Grundlagen

Der Förster-Resonanzenergietransfer stellt einen physikalischen Prozess der strahlungsfreien Energieübertragung zwischen zwei Chromophoren dar, dessen erste Beschreibung auf Theodor Förster zurückgeht (Förster 1948). Dabei kommt es nach der Anregung des als Donor (D) bezeichneten Chromophors, ohne den Austausch von Photonen, zu einer Übertragung der aufgenommenen Energie auf einen zweiten Chromophor, den sog. Akzeptor (A). Durch diese Übertragung erfolgt eine Anregung des Akzeptors, obwohl nur Licht mit der Anregungswellenlänge des Donors genutzt wird. Die Energie kann nun vom Akzeptor als Licht oder in Form anderer elektromagnetischer Wellen (z.B. Wärme) emittiert werden. Gleichzeitig führt die Übertragung zum *Quenching* (engl. Fluoreszenzlöschung) des Donors, sodass dessen Emissionsintensität abnimmt oder ganz gelöscht wird („gequencht“). Mechanistisch ist die Übertragung mit einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den  $\pi$ -Elektronensystemen der Chromophore zu erklären. Dabei geht die Energie des angeregten  $\pi$ -Elektrons im Zustand  $S_1$  als Schwingungsenergie (Resonanz) auf ein  $\pi$ -Elektron des Akzeptors über und regt dieses unter Erhaltung des Spins von seinem Grundzustand  $S_0$  in den Zustand  $S_1$  an. Das  $\pi$ -Elektron des Donors kehrt zurück in seinen Grundzustand  $S_0$  (vgl. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Vereinfachtes Jablonski-Schema des FRET-Mechanismus.** Die äußeren Schemata zeigen Donor und Akzeptor getrennt voneinander. Hier kommt es zur Anregung des Elektrons im Zustand  $S_0$  mit der jeweils spezifischen Wellenlänge (Wellenlinie aufwärts). Ein Teil der aufgenommenen Energie wird im Zustand  $S_1$  in Wärme- und Schwingungsenergie umgewandelt (gezackte Linie abwärts), sodass die Emissionsenergie des abgegebenen Photons (Wellenlinie abwärts) geringer ist als die des aufgenommenen. Die Differenz bezeichnet man als Stoke-Verschiebung. Beim FRET überträgt der Donor in  $S_1$  einen Teil der Energie in Form von Schwingungsenergie an den Akzeptor (gezackte rote Linie) und induziert dessen Schwingung hin zum Zustand  $S_1$ . Die über die Resonanz aufgenommene Energie kann vom Akzeptor nun als Photon abgegeben werden.

Die Effizienz des Energietransfers ( $E_{FRET}$ ) ist dabei im Wesentlichen von drei Faktoren abhängig (vgl. Abbildung 6). Zunächst ist dies die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit

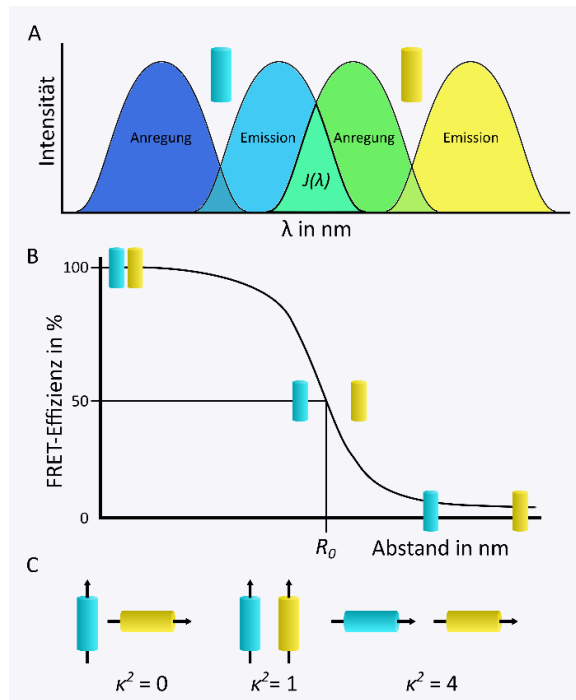
dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Außerdem von Bedeutung ist die gegenseitige Orientierung der Dipole von Donor und Akzeptor. Zuletzt entscheidend für den Transfer ist der räumliche Abstand beider Chromophore zueinander ( $r_{D-A}$ ), wobei dieser typischerweise 1 – 10 nm beträgt. Die FRET-Effizienz nimmt dabei mit der sechsten Potenz des Abstandes ab. Für die Berechnung des Abstandes (Formel 1) ist der Förster-Radius ( $R_0$ ) der FRET-Partner ausschlaggebend. Dieser definiert den Abstand, bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt.

$$r_{D-A} = R_0 \left( \frac{1}{E_{FRET}} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} \quad (1)$$

Zur Berechnung von  $R_0$  (Formel 2) ist die Kenntnis verschiedener Größen notwendig, die einerseits spezifisch aus den FRET-Partnern hervorgehen und andererseits auch aus der Versuchsumgebung, in der sie eingesetzt werden. Dabei definiert  $\kappa^2$  den Orientierungsfaktor der Dipole und kann Werte zwischen 0 und 4 einnehmen. Der Brechungsindex  $n$  ist abhängig vom Medium, in dem die FRET-Effizienz gemessen wird.  $Q_D$  gibt die Quantenausbeute des Donors an. Das Integral  $J(\lambda)$  ergibt sich aus dem Überlappungsbereich der Spektren, zu dessen Berechnung neben der normalisierten Donoremission ( $F_D(\lambda)$ ) noch der molare Extinktionskoeffizient des Akzeptors genutzt wird (Formel 3) (Sahoo 2011).

$$R_0 = [8,79 \cdot 10^{-5} (\kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot Q_D \cdot J(\lambda))]^{\frac{1}{6}} \quad (2)$$

$$J(\lambda) = \frac{\int F_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda}{\int F_D(\lambda) \cdot d\lambda} \quad (3)$$

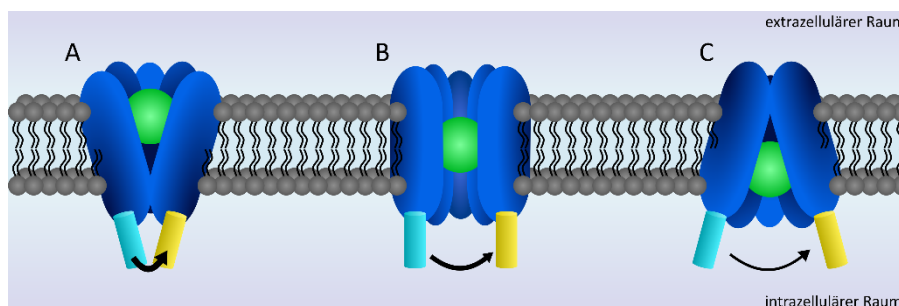


**Abbildung 6: Grundlagen des Förster-Resonanzenergietransfers. (A)** Spektren des Donors (■) und Akzeptors (■) mit dem Überlappungsintegral ( $J(\lambda)$ ) des Emissionsspektrums des Donors und dem Anregungsspektrum des Akzeptors. **(B)** Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz mit dem Förster-Radius ( $R_0$ ) bei 50 %. **(C)** Darstellung der Orientierung der FRET-Partner bei definierten Werten für  $\kappa^2$ , von links nach rechts: orthogonal, parallel und kollinear.

### 1.3.2 Praktische Anwendung

Aufgrund seiner Abstandsabhängigkeit wird FRET gemeinhin auch als spektroskopisches Lineal bezeichnet. Diese Eigenschaft ermöglicht es Abstände und Abstandsänderungen zwischen Molekülen (intermolekulares FRET) oder innerhalb eines Moleküls (intramolekulares FRET) zu messen. FRET kommt deshalb auch in zahlreichen biochemischen und molekularbiologischen Methoden zum Einsatz. Anwendung findet es u. a. bei der Untersuchung von Proteininteraktionen. Hierbei werden die potenziellen Interaktionspartner mit FRET-Partnern ausgestattet, sodass eine Interaktion beider Proteine in einem FRET-Signal resultiert. Wie bereits erwähnt, kann FRET aber auch dazu genutzt werden, um Konformationsänderungen nachzuweisen (Truong und Ikura 2001). Etabliert werden konnten u. a. Methoden zu FRET-basierten Untersuchungen von ABC-Transportern, wie dem P-gp. Diese liefern Ergebnisse zur grundlegenden Struktur und auch zu den Veränderungen im Molekül nach Bindung eines Substrats (Husada et al. 2015; Zarrabi et al. 2014). FRET wird außerdem zur Aufklärung der Aktivierungsmechanismen von Rezeptoren verwendet. Auch hier dient FRET zur Messung der Konformationsänderung bspw. nach Bindung eines Agonisten an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Hoffmann et al. 2005). Die Methoden basieren dabei entweder auf der Nutzung von fluoreszierenden Proteinen oder Cystein-Mutanten, die Farbstoffe binden können. Bei den fluoreszierenden Proteinen sind insbesondere das *green fluorescent protein* (GFP) und seine mittlerweile zahlreichen Varianten von großer Bedeutung. Sie haben den Vorteil, dass man sie durch Bildung von Fusionsproteinen direkt mit dem zu untersuchenden Protein verknüpfen kann. Noch weit- aus größer ist die Auswahl an organischen Farbstoffen. Allerdings bieten die meisten den Nachteil, dass sie nicht für *in vivo*-Untersuchungen geeignet sind. Die Ursache dafür liegt in der Bindung an einzelne Cysteine. Diese liegen *in vivo* allerdings nicht nur in dem zu markierenden Protein vor, was letztlich zu unspezifischen Färbungen führt. Als Alternative stehen Farbstoffe zur Verfügung, die bspw. an spezifische Cystein-Sequenzen binden. Da diese Sequenzen in der Natur ausreichend selten vorkommen, kann durch ihre Nutzung eine hinreichend spezifische Färbung erreicht werden. Ein kommerziell erhältlicher Farbstoff ist FIAsh-EDT<sub>2</sub> (*fluorescein arsenical hairpin binder-ethanedithiol*). FIAsh bindet an ein Tetracystein-Motiv (TC-Motiv), das durch gezielte Mutagenese eingeführt werden kann (Griffin et al. 2000).

Vor diesem Hintergrund gibt es verschiedene Möglichkeiten FRET bei den OATPs anzuwenden. Bereits gezeigt werden konnte am Beispiel des OATP2B1, dass eine C-terminale Verknüpfung mit GFP zu keiner Beeinflussung der Transportfunktion führt (Köck et al. 2010). Mit einem C-terminal gebundenen Fluoreszenzprotein wäre damit bereits ein FRET-Partner integriert. Da der C-Terminus intrazellulär gelegen ist, müsste auch der andere FRET-Partner intrazellulär eingefügt werden. Hier eignen sich die IZS als potenzielle Orte. Um beide beschriebenen Varianten auszuschöpfen, kommen als FRET-Paare bspw. das *enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP) mit dem *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) oder ECFP mit FAsH in Frage. Dabei fungiert ECFP stets als Donor und EYFP bzw. FAsH als Akzeptoren. Der Theorie nach müsste FRET in den beobachteten Abständen nicht nur allein messbar, sondern weiterhin auch durch die ablaufenden Konformationsänderungen zu beeinflussen sein. Demnach sollte der substratinduzierte Konformationswechsel mit einer Abstandsänderung der IZS einhergehen. Dies sollte unter Annahme des *Rocker-switch*-Mechanismus dazu führen, dass sich die integrierten Fluorophore verschieben und es aufgrund der Abstandsabhängigkeit von FRET zu einer Änderung der FRET-Effizienz kommt (vgl. Abbildung 7).



**Abbildung 7: Rocker-switch-Mechanismus mit modifiziertem Transporter.** (A) Bei Substratbindung liegen Donor (■) und Akzeptor (■) nah beisammen, es ist mit einer hohen FRET-Effizienz zu rechnen. (B) Während der substratinduzierten Konformationsänderung verlieren die FRET-Partner an räumlicher Nähe, die FRET-Effizienz nimmt ab. (C) Donor und Akzeptor sind bei der Substratfreisetzung weit voneinander entfernt, die FRET-Effizienz erreicht ihr Minimum. Generell ist auch davon auszugehen, dass sich nicht nur die Distanz, sondern auch die Orientierung verändert.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der Anforderungen von EMA und FDA ist die Untersuchung von Wirkstoff-Wirkstofftransporter-Interaktionen zum Standard geworden. Die etablierten Methoden für die OATPs sind allerdings entweder zeitintensiv (Analytik) oder mit hohen Kosten verbunden (radioaktive Tracer). Um die Analyse der umgesetzten Substrate zu vermeiden, wäre eine FRET-Methode als Alternative denkbar. Diese könnte auf Basis des Wissens um die Struktur der OATPs sowie ihres vorausgesagten Transportmechanismus umgesetzt werden. Ziel dieser Arbeit ist es, die praktische Umsetzung einer solchen Methode zu testen. Dazu soll der ausgewählte Vertreter OATP2B1 zunächst so modifiziert werden, dass ein FRET-Signal messbar wird.



Die Modifikation beinhaltet die Herstellung verschiedener Fusionsproteine mit den FRET-Partnern ECFP/EYFP einerseits und ECFP/FlAsH andererseits. Dabei soll ECFP an den C-Terminus des Proteins geknüpft und EYFP/FlAsH in verschiedene intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen integriert werden. Mithilfe der hergestellten Konstrukte sowie geeigneter Kontrollen soll die FRET-Messung mit den gängigen Messmethoden *photobleaching* und *sensitized emission* etabliert werden. Kern der Arbeit sollen darauf aufbauend drei wesentliche Fragestellungen sein. Zunächst soll mittels der Fusionsproteine untersucht werden, inwieweit sich intramolekulares FRET in OATPs als Möglichkeit zur Strukturaufklärung eignet. Daneben sollen die FRET-Messungen auch in Gegenwart verschiedener Substanzen erfolgen. Dies soll beantworten, ob sich das intramolekulare FRET in Abhängigkeit der Transporteraktivität modifizieren lässt und damit die Basis eines potenziellen Screening-Modells bilden könnte. Außerdem soll geklärt werden, welchen Einfluss die genannten Modifikationen auf die Funktion des Transportproteins haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Sämtliche Verbrauchsmaterialien, Geräte und Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen, entsprachen aktuellen wissenschaftlichen Standards. Sie kamen alle zweckmäßig zum Gebrauch. Eine dezidierte Auflistung befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Grundlegende molekularbiologische Methoden

##### 2.2.1.1 Klonierung

Eine Klonierung zielt darauf ab, ein bestimmtes DNA-Fragment in einen Vektor, z.B. ein Plasmid, zu überführen. Dieser kann *in vivo* vervielfältigt, isoliert und zur gezielten Überexpression codierter Proteine verwendet werden. Zur Klonierung sind verschiedene Schritte notwendig, die in den Kapiteln 2.2.1.2 – 2.2.1.12 näher erläutert werden (vgl. Abbildung 8).

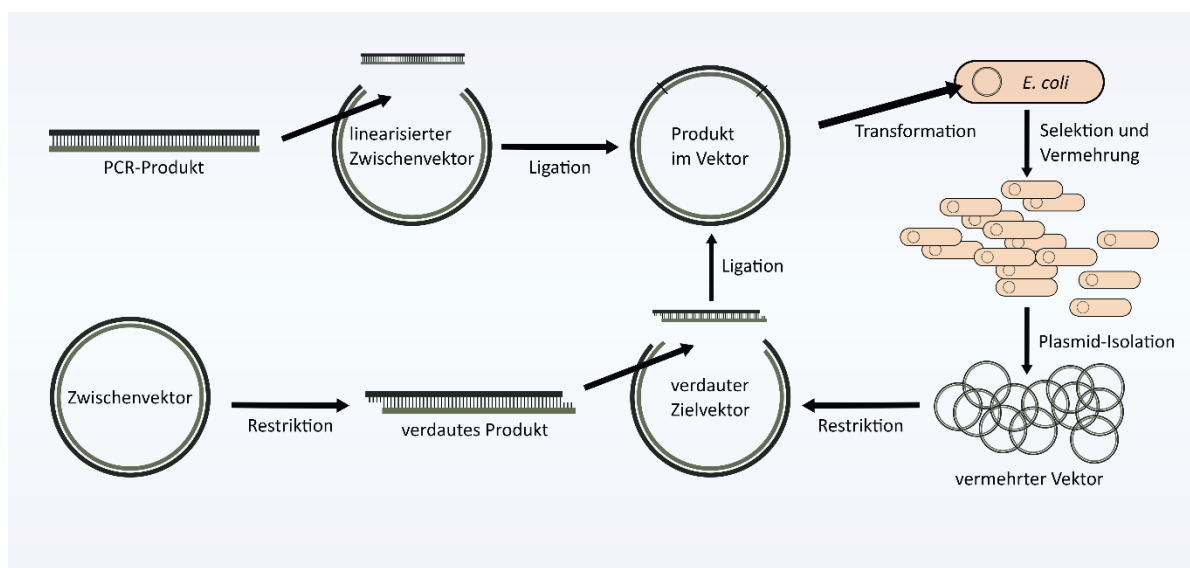


Abbildung 8: Übersicht eines Klonierungsprozesses

##### 2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) ist eine der bis heute gängigsten Methoden zur *in vitro*-Amplifikation von DNA. Sämtliche durchgeführten Klonierungsarbeiten nahmen ihren Ausgang in einer PCR. Der wesentliche Ablauf einer PCR ähnelt

dem der *in vivo*-Amplifikation von DNA, wobei im Unterschied zu dieser nur ein einziges Enzym, eine thermostabile DNA-Polymerase, zum Einsatz kommt. Alle weiteren Schritte werden physikalisch durch die Anwendung eines sich wiederholenden Temperaturgradienten herbeigeführt. Die neben der DNA-Polymerase eingesetzten Substanzen und die Zusammensetzung des verwendeten PCR-Reaktionsgemisches sind in Tabelle 1 gelistet. Das im Thermalcycler angewandte Temperaturprogramm ist in Tabelle 2 dargestellt. Abweichungen von Tabelle 1 oder Tabelle 2 sind im Abschnitt 2.2.2 angegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches

Substanz	Volumen
PfuUltra Hotstart Polymerase (2,5 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
PfuUltra HF Puffer (10 $\times$ )	5 $\mu$ L
DNA-Template (100 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Primer-F (10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ L
Primer-R (10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ L
dNTPs (10 mM)	2,5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	35,5 $\mu$ L

Tabelle 2: Temperatur-Zeit-Profil des Thermalcyclers

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	30
65 °C	30 s	
72 °C	1 min/1 kb	
72 °C	5 min	1
4 °C	$\infty$	1

### 2.2.1.3 Gezielte Mutagenese

Zum Austausch von Basen in einer DNA-Sequenz kann eine gezielte Mutagenese durchgeführt werden. Der Ablauf der hierzu genutzten Methode basiert auf einer Abwandlung der PCR (2.2.1.2). Abweichend davon werden zueinander komplementäre, mutagene Primer genutzt. Das ursprüngliche, nicht mutierte Plasmid wird im Anschluss durch das Enzym *DpnI* abgebaut. Detaillierte Angaben zu den etablierten Mutagenesen sind im Abschnitt 2.2.2 zu finden.

### 2.2.1.4 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau dient allgemein dem Schneiden von DNA. Die dabei eingesetzten Restriktionsenzyme besitzen hierfür spezifische Erkennungssequenzen, an die sie binden und die DNA hydrolysieren. Die dabei entstehenden charakteristischen Schnittmuster können anschließend wieder mit ihresgleichen zusammengefügt werden (2.2.1.7). Dadurch lassen sich mit gleichen Enzymen verdaute DNA-Fragmente, z.B. proteincodierende Gene und Expressionsvektoren, miteinander kombinieren (vgl. Abbildung 8). Der Erfolg solcher Kombination kann anschließend ebenfalls durch einen Kontrollverdau überprüft werden. Die Zusammensetzung des verwendeten Restriktionsreaktionsgemisches ist in Tabelle 3 gelistet. Sämtliche Verdaue wurden bei 37 °C über eine Zeit von 5 min durchgeführt (Ausnahme: *NotI*, t = 15 min).

Tabelle 3: Zusammensetzung des Restriktionsreaktionsgemisches

Substanz	Volumen
FastDigest Green Puffer (10×)	2 µL
FastDigest Enzym 1	1 µL
(FastDigest Enzym 2)	(1 µL)
DNA (100 – 1000 ng/µL)	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

### 2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese eignet sich dazu, Nukleinsäuren, wie DNA, aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld aufzutrennen. Als Medium für diese Auftrennung wird gelbildende Agarose genutzt. Hierzu wird die Agarose-Lösung bis zum Kochen erhitzt, woraufhin sie beim Abkühlen ein Gel bildet. Je nach Konzentration des Agarose-Gels bilden unterschiedliche Porengrößen aus. Diese bestimmen neben dem Molekulargewicht der aufzutrennenden DNA die Wanderungsgeschwindigkeit derselben im elektrischen Feld. Durch Hinzufügen des Farbstoffs Ethidiumbromid, das nach Interkalation in die DNA eine verstärkte Fluoreszenz zeigt, können die DNA-Banden unter UV-Licht visualisiert werden. Die so detektierten Banden können mithilfe von DNA-Größenmarkern interpretiert und zur präparativen Aufreinigung (2.2.1.6) ausgeschnitten werden. Je nach DNA-Fragment wurden Agarosegele mit den Konzentrationen 0,8; 1 oder 2 % genutzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V.

### 2.2.1.6 Präparative DNA-Aufreinigung

Die Isolation von DNA aus Agarose-Gelen (2.2.1.5) oder PCR-Reaktionsgemischen (2.2.1.2) erfolgte mit dem Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* nach der Anleitung des Herstellers. Abweichend hiervon wurde zur Elution nicht der mitgelieferte Elutionspuffer, sondern ddH<sub>2</sub>O genutzt.

### 2.2.1.7 Ligation

Die Ligation wird genutzt, um DNA-Fragmente enzymatisch mithilfe einer DNA-Ligase zu verknüpfen. Die DNA-Fragmente können ihren Ursprung dabei in einer PCR (2.2.1.2) oder einem Restriktionsverdau (2.2.1.4) haben. Daneben wurde mit dem *pJet1.2/blunt* auch ein bereits linearisierter Vektor benutzt. Voraussetzungen für eine erfolgreiche Ligation sind, dass die zu kombinierenden DNA-Fragmente entweder zueinander komplementäre Basen an ihren Überhängen besitzen (charakteristisches Schnittmuster von Restriktionsenzymen, *sticky ends*) oder aber überhaupt keine Überhänge (*blunt ends*). Die Zusammensetzung des genutzten Ligationsreaktionsgemisches ist in Tabelle 4 aufgeführt. Sämtliche Ligationsreaktionen erfolgten bei 4 °C über Nacht.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Ligationsreaktionsgemisches

Substanz	Volumen
T4 DNA Ligase Puffer (10×)	1 µL
T4 DNA Ligase (3 U/µL)	1 µL
einzufügende DNA (20 – 100 ng/µL)	1 µL
Vektor-DNA (einzufügende DNA/3 ng/µL)	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µL

### 2.2.1.8 Transformation kompetenter Zellen

Der Begriff der Transformation umfasst die nicht-virale Übertragung von freier DNA auf eine bakterielle Zelle. Die hierfür genutzte Variante schließt die Verwendung von chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien (*SoloPack® Gold Supercompetent Cells*) sowie einen Hitzeschock (42 °C, 45 s) ein. Vor dem Hitzeschock wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und zu 25 µL Bakteriensuspension entweder 1 µL eines Ligationsreaktionsgemisches (2.2.1.7) oder 50 ng eines Plasmidvektors gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgtem Hitzeschock

wurde die Suspension für 2 min auf Eis gelagert und anschließend mit 175 µL LB-Medium versetzt und bei 37 °C und 225 rpm für 1,5 h geschüttelt. Um keimarme Bedingungen zu schaffen, wurde in direkter Nähe zu einer Bunsenbrennerflamme gearbeitet.

#### **2.2.1.9 Selektion positiver Klone**

Da die verwendeten Plasmidvektoren Resistenzgene für Antibiotika enthalten, ist es möglich, erfolgreich transformierte Bakterien auf Agarböden zu selektieren. Dafür genutzt wurde Kulturagar für *E. coli*, versetzt mit 252,5 µM Ampicillin oder 43 µM Kanamycin. Auf diesen Agarplatten wurden dann 50 – 200 µL der transformierten Bakteriensuspension (2.2.1.8) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden einzeln isoliert und in einer Übernachtskultur in antibiotikahaltigem (Konzentration vgl. Agar) LB-Medium bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt.

#### **2.2.1.10 Präparative Plasmid-Isolation**

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli*-Übernachtskulturen (2.2.1.9) erfolgte je nach verwendetem Volumen mit dem Kit *NucleoBond® Xtra Midi Plus* (bis 200 mL) oder dem Kit *NucleoSpin® Plasmid* (bis 2 mL) nach der Anleitung des Herstellers. Abweichend hiervon wurde zur Elution nicht der mitgelieferte Elutionspuffer, sondern ddH<sub>2</sub>O genutzt.

#### **2.2.1.11 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren**

Aufgrund der heteroaromatischen Ringsysteme kann die Konzentration von Nukleinsäuren, wie DNA, photometrisch bestimmt werden. Dazu wurde je 1 µL der DNA-Lösung im Spektralphotometer *NanoDrop™ 1000* bei 260 nm vermessen. Die Reinheit der Proben wurde über die Quotienten 260/280 nm (Richtwert 2,0) und 260/230 nm (Richtwert 2,0 – 2,2) ermittelt.

#### **2.2.1.12 Sequenzierung**

Die Sequenzierung hergestellter Plasmide erfolgte extern durch die Firma Eurofins Genomics GmbH. Das angewandte Verfahren ist das Cycle-Sequencing, das mithilfe eines kommerziellen DNA-Analysegeräts durchgeführt wird. Die Aufbereitung der versendeten Proben erfolgte nach den Angaben des Dienstleisters.

## 2.2.2 Spezielle molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Generierung des *OATP2B1-ECFP*-Fusionsvektors

Zur Generierung des *OATP2B1-ECFP*-Fusionsvektors wurde zunächst eine PCR (2.2.1.2) mit den Primern *2B1-XhoI-F* und *2B1-HindIII-R* durchgeführt. Als DNA-Template diente dabei ein *pcDNA™3.1/Hygro<sup>(-)</sup>*-Vektor, der *OATP2B1*-cDNA enthielt. Das PCR-Produkt wurde gereinigt (2.2.1.6) und in einen *pJet1.2/blunt* ligiert (2.2.1.7). Der hergestellte Vektor wurde in *E. coli* vermehrt (2.2.1.8 – 2.2.1.10) und anschließend parallel mit dem *pECFP-N1*-Vektor von den Enzymen *XhoI* und *HindIII* verdaut (2.2.1.4). Nach Auftrennung (2.2.1.5) und Aufreinigung konnte das *OATP2B1*-Fragment in den linearisierten *pECFP-N1*-Vektor integriert werden. Die Überprüfung der erfolgreichen Klonierung erfolgte nach Vermehrung des Vektors durch einen Kontrollverdau und eine Sequenzierung (2.2.1.12).

### 2.2.2.2 Generierung der *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Fusionsvektoren

Grundlage zur Herstellung der *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Fusionsvektoren war der im Abschnitt 2.2.2.1 hergestellte Vektor. Dieser wurde jeweils mit den folgenden Primerpaaren mutiert (2.2.1.3): *2B1-BssHII-S1*, *2B1-BssHII-S2*, *2B1-BssHII-S5*, *PacI-2B1-Mut*, *extrazS2-PteI*, *extrazS5-PteI*. Der Basenaustausch brachte die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BssHII* (*PteI*) und *PacI* jeweils in eine IZS (1 – 5) oder EZS (2 und 5) der enthaltenden *OATP2B1*-cDNA ein. Die Zusammensetzung des Mutagenese-Reaktionsgemisches ist in Tabelle 5 angegeben, das Temperaturprogramm in Tabelle 6. Der *DpnI*-Verdau erfolgte durch Zugabe von 1 µL Enzym zum Mutagenese-Reaktionsgemisch. Die hergestellten mutierten Vektoren wurden anschließend vermehrt, sequenziert und mit den Restriktionsenzymen *BssHII* (*PteI*) bzw. *PacI* verdaut (2.2.1.8 – 2.2.1.12, 2.2.1.4). Parallel dazu erfolgte die Amplifizierung der für EYFP codierenden Sequenz mit den Primerpaaren *YFP-Pac-neu* und *YFP-BssHII* aus dem *pEYFP-N1*-Vektor (2.2.1.2). Das jeweilige PCR-Produkt wurde in den *pJet1.2/blunt* eingebracht, vermehrt, isoliert (vgl. 2.2.2.1) und ebenfalls mit den Enzymen *BssHII* (*PteI*) bzw. *PacI* verdaut. Die ausgeschnittenen EYFP-Fragmente sowie die verdauten mutierten Vektoren wurden aufgereinigt und miteinander ligiert (2.2.1.5 – 2.2.1.7). Die hergestellten Vektoren wurden vermehrt, isoliert und durch Kontrollverdaue sowie Sequenzierungen überprüft.

Tabelle 5: Mutagenese-Reaktionsgemisch (*EYFP*- bzw. *FIAsH-OATP2B1-ECFP*)

Substanz	Volumen
PfuUltra Hotstart Polymerase (2,5 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
PfuUltra HF Puffer (10 $\times$ )	5 $\mu$ L
DNA-Template (50 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Primer-F (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Primer-R (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	40 $\mu$ L

Tabelle 6: Temperatur-Zeit-Profil (*EYFP-OATP2B1-ECFP* bzw. *FIAsH-OATP2B1-ECFP*)

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	18
50 °C	30 s	
72 °C	7 min (1 min/kb)	
72 °C	15 min	1
4 °C	$\infty$	1

### 2.2.2.3 Generierung der *FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Mutanten

Zur Anfärbung von Proteinen mittels FIAsH-EDT<sub>2</sub> müssen diese eine spezifische Bindungssequenz aufweisen, das Tetracystein-Motiv (CCPGCC). Eine hierfür codierende Nukleotidsequenz kann mittels gezielter Mutagenese in die Sequenz eines Proteins integriert werden. Grundlage zur Herstellung der *FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Mutanten war der im Abschnitt 2.2.2.1 hergestellte Vektor des *OATP2B1-ECFP*. Die Mutagenesen erfolgten analog zu den *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Konstrukten in den IZS (2 – 5) sowie einigen EZS (2 und 5). Aufgrund der teilweise zahlreichen Basenaustausche erfolgte die Mutagenese der IZS in zwei Schritten. In einem ersten Schritt wurde mit den folgenden Primerpaaren mutiert: *S2-FIAsH-pr*, *S4-FIAsH-pr*, *S5-FIAsH-pr*, *2B1-FIAsH-nPG*. Die mutierten Vektoren wurden anschließend in einem zweiten Schritt der finalen Mutagenese mit folgenden Primerpaaren unterzogen: *S2-FIAsH*, *S4-FIAsH*, *S5-FIAsH*, *2B1-FIAsH-nmPG*. Daneben erfolgte ohne Vorbehandlung eine Mutagenese mit den Primerpaaren *exS2-FIAsH* sowie *exS5-FIAsH*. Nach Vermehrung der Vektoren erfolgte eine Sequenzierung zur Kontrolle (vgl. 2.2.2.2).



#### 2.2.2.4 Generierung der FIAsh-Kontrollvektoren

Für die Etablierung der FRET-Messungen mit FIAsh sind geeignete Kontrollvektoren notwendig. Dazu wurde ein Vektor erstellt, bei dem das Tetracystein-Motiv an ECFP geknüpft ist (*FIAsh-ECFP-Fusionsvektor*) und der als FRET-Positivkontrolle dienen kann. Daneben wurde das Tetracystein-Motiv auch allein in den *pECFP*-Vektor eingefügt (*FIAsh-Positivkontrolle*), um doppelt transfiziert mit ECFP als FRET-Negativkontrolle zu dienen. Zur Herstellung dieser FIAsh-Kontrollen wurden die Primer-Paare *FIAsh-Nterm* (*FIAsh-ECFP-Fusionsvektor*) und *FIAsh-positiv* (*FIAsh-Positivkontrolle*) dimerisiert. Dazu wurde ein Gemisch aus jeweils 20 µL beider Primer (100 µM), 20 µL ddH<sub>2</sub>O und 20 µL NaCl-Lösung (5 M) hergestellt und für 10 min bei 95 °C im Cycler erhitzt. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend in Alufolie gewickelt und abgekühlt. Die Ligation erfolgte mit einer 1:200-Verdünnung der dimerisierten Primer und dem linearisierten *pECFP-N1*-Vektor, wobei für die Primer-Paare *FIAsh-Nterm* die Enzyme *HindIII* und *PstI*, für *FIAsh-positiv* *HindIII* und *NotI* zur Linearisierung verwendet wurden. Nach Vermehrung der Vektoren erfolgte eine Sequenzierung zur Kontrolle (2.2.1.4 – 2.2.1.12).

#### 2.2.3 Zellbiologische Methoden

Die zellbiologischen Methoden wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen durchgeführt. Sämtliche Arbeiten erfolgten daher unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II und mit sterilen Verbrauchsmaterialien.

##### 2.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Genutzte Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Gefäß dienten 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen, gefüllt mit 18 mL DMEM-Medium und 2 mL Zellsuspension aus vorangegangener Passage (Umsetzung 1 zu 5). Die Passage der Zellen wurde bei nahezu 100 % Konfluenz und je nach Bedarf ein bis zweimal wöchentlich durchgeführt. Zur Passage wurden das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 10 mL PBS (37 °C) gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 3 mL Trypsin und einer Inkubation im Brutschrank. Die suspendierten Zellen wurden je nach gewünschter Verdünnung mit variierenden Volumina Kulturmedium versetzt und auf die nächste Flasche übertragen.

##### 2.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Lagerung von Zellen wurde eine Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) genutzt. Dazu wurden die suspendierten Zellen (vgl. 2.2.3.1) bei 1000 × g für 5 min zentrifugiert,

der Überstand vom entstandenen Pellet abgenommen und die Zellen in Einfriermedium resuspendiert ( $10^6$  Zellen/mL). Je 1 mL wurde in Kryoröhrchen gefüllt und in einem Gefrierbehälter bei  $-1\text{ °C/min}$  eingefroren ( $-80\text{ °C}$ ). Nach 24 h wurden die Röhrchen in den flüssigen Stickstoff überführt. Die Wiederinkulturnahme der Zellen erfolgte durch Auftauen bei  $37\text{ °C}$  im Wasserbad.

### 2.2.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Zellzählgerät *Casy® Model TT*. Dazu wurden 50  $\mu\text{L}$  der zu messenden Zellsuspension in 10 mL CASYton verdünnt und zweimal 400  $\mu\text{L}$  Probenvolumen vermessen. In die Zählung wurden Zellen mit einem Durchmesser von  $9 - 50\text{ }\mu\text{m}$  aufgenommen.

### 2.2.3.4 Aussaat von Zellen

Die Aussaat von Zellen erfolgte je nach geplanter Verwendung in 6- oder 24-well-Zellkulturplatten bzw. 8-well-Kammerdeckgläsern. Dazu wurde eine entsprechende Menge an Zellen in Kulturmedium suspendiert (6-well: 2 mL Medium, 24-well: 1 mL, 8-well: 250  $\mu\text{L}$ ) und in die Wells überführt. Die Zellzahl richtete sich dabei nach dem Zeitplan des durchzuführenden Experiments und ist im entsprechenden Abschnitt näher definiert.

### 2.2.3.5 Transfektion von Zellen

Als Transfektion wird die Übertragung von Fremd-DNA, bspw. Plasmidvektoren, auf eine eukaryotische Zelle bezeichnet. Diese kann temporär (transient) oder dauerhaft (stabil, 2.2.3.6) erfolgen. Hierfür genutzt wurde die Lipofektion mittels *Lipofectamin 2000*. Die Zahl der ausgesäten Zellen wurde so gewählt, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 80 % Konfluenz aufwiesen. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Gewählte DNA-Massen und *Lipofectamin*-Volumina lagen dabei im Verhältnis von 1  $\mu\text{g}$  DNA auf 2  $\mu\text{L}$  *Lipofectamin*. Die Inkubationszeiten richteten sich nach der sich anschließenden Methode (FRET-Messungen: 24 h; Transporterassays: 48 h). Die Optimierung für die Transfektion in 8-well-Kammerdeckgläsern ist im Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

### 2.2.3.6 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Nach einer Lipofektion (2.2.3.5) von MDCKII-Zellen in 6-well-Platten wurden nach 2 Tagen unterschiedliche Verdünnungen (1:500, 1:1000, 1:2000 in 25 mL Kulturmedium) der trypsinisierten Zellen (2 mL) auf  $15\text{ cm}^2$  Zellkulturschalen ausplattiert. Da die verwendeten Vektoren eine

Resistenz für Geneticin enthalten, konnten unter Zugabe des Antibiotikums (2 mM) stabil transfizierte Klone selektiert werden. Von den gewachsenen Kolonien wurden anschließend solche isoliert, die eine Fluoreszenz (ECFP) aufwiesen (vgl. 2.2.6.1). Zur Isolation wurde das Medium abgenommen und einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1  $\mu$ L Trypsin direkt auf die Kolonie wurde für 5 min bei RT inkubiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde die Kolonie anschließend gelöst und auf eine 24-well-Platte mit 1 mL Zellkulturmedium übertragen. Nach Erreichen von nahezu 100 % Konfluenz erfolgte eine Übertragung der Zellen auf eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 7 mL Zellkulturmedium. Wiederum bei etwa 100 % Konfluenz wurden die Zellen auf eine 75 cm<sup>2</sup> Flasche passagiert (2.2.3.1). Sämtliche Kultivierungsschritte geschahen unter Einsatz von Geneticin (2 mM).

### 2.2.3.7 Proteinmarkierung mit FIAsh-EDT<sub>2</sub>

Um exprimierte Proteine, die ein Tetracystein-Motiv enthalten, intrazellulär anzufärben, wurde das *TC-FIAsh™ II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kit* verwendet. Die Bindung des FIAsh-EDT<sub>2</sub> erfolgt durch Ausbildung von Schwefel-Arsen-Bindungen zwischen den Cysteinen des Tetracystein-Motivs und den im FIAsh-EDT<sub>2</sub> enthaltenen Arsen-Atomen. Die Durchführung erfolgte dabei im Wesentlichen nach den Angaben des Herstellers, wobei die Inkubation mit 2,5  $\mu$ M FIAsh-EDT<sub>2</sub> über 30 min bei RT erfolgte. Für die 8-well-Kammerdeckgläser wurde ein *Opti-MEM*-Volumen von 125  $\mu$ M für die Färbelösung und 250  $\mu$ M für die Waschlösung genutzt. Die mikroskopische Detektion der Markierung ist im Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben.

## 2.2.4 Proteinanalytische Methoden

### 2.2.4.1 Isolation des Gesamtproteins

Zur Isolation des Gesamtproteins wurde ein Pellet aus trypsinierten Zellen hergestellt (vgl. 2.2.3.2.). Dieses wurde einmal mit PBS (5 mL) gewaschen, erneut zentrifugiert und daraufhin in 500  $\mu$ L 5mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7,4), zzgl. den Protease-Inhibitoren Aprotinin (0,462  $\mu$ M), Leupeptin (1  $\mu$ M) und PMSF (0,1 mM), resuspendiert. Die suspendierten Zellen wurden anschließend dreimal jeweils in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Final wurden sie bei 13 000  $\times g$  für 10 min zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zelltrümmer zu entfernen.-Abschließend wurde die Proteinkonzentration der aufgeschlossenen Zellen bestimmt (2.2.4.3).

#### **2.2.4.2 Isolation der Membranproteinfraktion**

Die Gewinnung der Membranproteinfraktion erfolgte aus aufgeschlossenen Zellen (vgl. 2.2.4.1). Dazu wurde deren Gesamtproteinlösung bei  $100\,000 \times g$  für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 200  $\mu$ L 5mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7,4), zzgl. den Protease-Inhibitoren Aprotinin (0,462  $\mu$ M), Leupeptin (1  $\mu$ M) und PMSF (0,1 mM), resuspendiert. Abschließend wurde die Proteinkonzentration der Membranfraktion bestimmt (2.2.4.3).

#### **2.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Kalibrationsgerade wurde mit BSA-Lösungen in den Konzentrationen 10, 20, 30, 40 und 50  $\mu$ g/ $\mu$ L erstellt. Die Messung erfolgte mit je 10  $\mu$ L Probenvolumen in einer Doppelbestimmung im Plattenlesegerät Infinite® M200 bei 562 nm.

#### **2.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Hierfür verwendet wurde ein diskontinuierliches Gel aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Die Zusammensetzung der beiden Gele befindet sich in Tabelle 7 und Tabelle 8. Beide Gele wurden in einem Verhältnis von 4:1 (Trenngel : Sammelgel) gegossen. Von jeder Probe wurden 50  $\mu$ g Protein eingesetzt. Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Das Gel wurde in die entsprechende Apparatur eingespannt, die dann mit Tankpuffer aufgefüllt wurde. Nach Auftragung der Proben wurde die Elektrophorese bei 90 V begonnen, bis sich die Proben an der Grenze zum Trenngel zu einer Bande aufkonzentriert hatten. Anschließend erfolgte die Auftrennung bei 120 V, bis der im Lämmli-Puffer enthaltene Indikator das Gel verlassen hatte. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde anschließend im Western Blot weiterverwendet (2.2.4.5).

Tabelle 7: Zusammensetzung des Sammelgels

Substanz	Zusammensetzung
H <sub>2</sub> O	
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	13 %
Sammelgel-Puffer	25 %
SDS (10 %-Lösung in H <sub>2</sub> O)	3,5 mM
APS (10 %-Lösung in H <sub>2</sub> O)	4,4 mM
TEMED	6,6 mM

Tabelle 8: Zusammensetzung des Trenngels

Substanz	Zusammensetzung
H <sub>2</sub> O	
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	33 %
Trenngel-Puffer	25 %
SDS	3,5 mM
APS	4,4 mM
TEMED	6,6 mM

#### 2.2.4.5 Western Blot

Die Übertragung der in Abschnitt 2.2.4.4 aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran wurde mittels Western Blot durchgeführt. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran luftblasenfrei auf das Gel gelegt und zwischen jeweils 3 Lagen Cellulose-Chromatographiepapier sowie einem Schwamm auf jeder Seite zusammengepackt. Die Packung wurde in die entsprechende Apparatur eingespannt und mit 4 °C kaltem Towbin-Puffer getränkt. Die Übertragung erfolgte bei einer Stromstärke von 370 A für 2 h unter Eiskühlung. Direkt nach der Übertragung erfolgte eine Fixierung der Proteine auf dem Blot mit Ponceau S-Lösung in Essigsäure für 5 min bei RT. Die Detektion der Proteine wurde anschließend immunchemisch durchgeführt. Dazu wurde der Blot zunächst für 30 min mit Blockierlösung behandelt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde der Blot dreimal für 10 min bei RT mit TBST gewaschen und erneut blockiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 2 h bei RT. Danach wurde der Blot dreimal für 10 min bei RT mit TBST gewaschen. Die Auswertung des Blots wurde mithilfe des Western Blot-Substrats *ECL Plus* im *ChemiDoc™* durch Messung der Chemielumineszenz durchgeführt.

### 2.2.5 Transporterassay

Zur Untersuchung der Transporterfunktion wurden Transportstudien durchgeführt. Vorausgehend erfolgte eine Aussaat der stabil transfizierten MDCKII-Zellen bzw. MDCKII-Zellen zur transienten Transfektion in 24-well-Platten (vgl. 2.2.3.4). Waren die Zellen transient zu transfizieren, erfolgte dies mit 500 ng Plasmid-DNA (vgl. 2.2.3.5). Der Transportversuch wurde bei einer Konfluenz von 100 % durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einmal mit 0,5 mL PBS (37 °C) gewaschen, mit 190 µL IP (37 °C, zzgl. radioaktiv markierter Substanzen und Inhibitoren bei Kompetitionsassays) versetzt und für 5 min bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Danach wurde der IP abgenommen und die Zellen dreimal mit 0,5 mL PBS (4 °C) gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 800 µL Lyse-Puffer und einer Inkubation bei RT über 30 min auf dem Kreisschüttler. 200 µL des Lysats wurden zu 2 mL Szintillationsflüssigkeit gegeben und im Szintillationszähler *Wallac 1409* vermessen.

### 2.2.6 Mikroskopische Methoden

#### 2.2.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit den Mikroskopen LSM 780 und Observer.Z1 angefertigt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte entweder mit einer Quecksilber-Kurzbogenlampe oder einem Argon-Ionen-Laser mit entsprechenden Filtern. Verwendete Objektive umfassten Vergrößerungen von 5-, 10-, 20- und 40-fach sowie 40-, 67- und 100-fach als Öl-Immersions-Objektive. Für die Aufnahmen wurde das Zellkulturmedium gegen PBS oder IP substituiert. Tabelle 9 gibt eine Übersicht der verwendeten Fluorochrome.

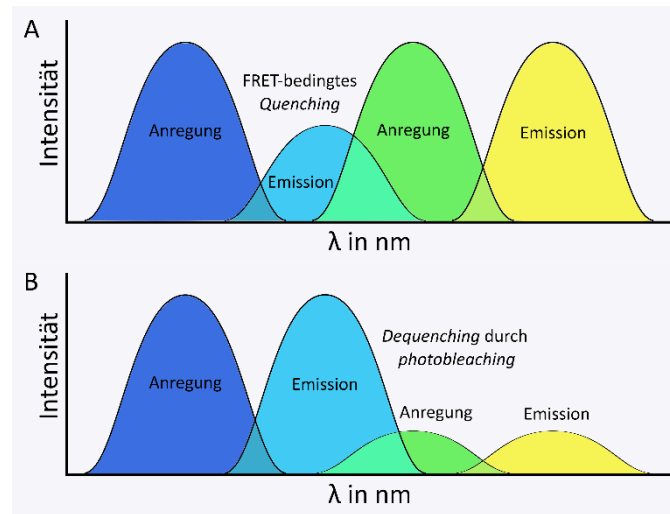
Tabelle 9: Fluorochrome mit ihren Parametern

Bezeichnung	Anregungswellenlänge	Emissionsbereich
ECFP	458 nm	459 – 514 nm
EYFP	514 nm	515 – 646 nm
FIAsH	514 nm	515 – 646 nm

#### 2.2.6.2 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Sämtliche FRET-Analysen wurden in Kammerdeckgläsern mithilfe des LSM 780 und dessen Betriebssoftware ZEN 2010 durchgeführt. Als Medium für die Messungen wurde IP (zzgl. Sub-

stanzen) verwendet. Der IP (37 °C) wurde unmittelbar vor Beginn der Messungen auf die Zellen gegeben. Die Messungen wurden anschließend über eine Dauer von maximal 30 min bei RT vorgenommen. Zur Messung wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.



**Abbildung 9: Vorgänge beim photobleaching.** (A) Kommt es zum FRET, ist die Intensität des Donors vermindert (*Quenching*). (B) Nach dem *photobleaching* des Akzeptors ist dessen fluorophores System zerstört. Er kann infolgedessen keine Energie mehr vom Donor aufnehmen. Dieser strahlt daraufhin eine Emission höherer Intensität als vor dem Bleichen aus. Der Unterschied der Emissionsintensität des Donors lässt auf die zuvor mittels FRET übertragene Energie schließen.

Beim *photobleaching* wird das fluorophore System des Akzeptors zerstört. Dadurch kommt es zu einer messbaren Zunahme der Fluoreszenzintensität des Donors, dem sog. *Dequenching* (vgl. Abbildung 9). Da diese Zunahme eine Aussage darüber zulässt, wieviel Energie zuvor strahlungslos übertragen wurde, kann die Effizienz über den Quotienten der Donor-Intensität vor ( $D_V$ ) und nach ( $D_N$ ) dem Bleichen berechnet werden (Formel 4).

$$E_{FRET} = \frac{D_N - D_V}{D_N} \quad (4)$$

Zur Messung wurden die Einstellungen des Lasers und der Filter je nach FRET-Paar so gewählt, dass einerseits eine ausreichende Detektion gegeben war und andererseits ein Überstrahlen vermieden wurde. Die Größe der Lochblende wurde auf 1 AU festgelegt, um das Signal-Rausch-Verhältnis gering zu halten. Das Bleichen erfolgte für 100 *iterations* (Wiederholungen) bei maximaler Laserstärke (Wellenlänge 514 nm). Die Festlegung der zu messenden Bereiche (*region of interest*, ROI) erfolgte über die fluoreszierenden Bereiche der Zelle, wobei im Mittelwert zwei ROI pro Zelle gesetzt wurden. Vor und nach dem Bleichen wurden jeweils fünf Messungen erhoben, deren Mittelwerte für  $D_V$  und  $D_N$  zur Berechnung nach Formel 4 genutzt wurden. Weiterhin wurde über eine ROI außerhalb der Zellen die Hintergrundemission gemessen und dessen Mittelwert ( $D_H$ ) für jeden einzelnen Messwert zur Korrektur genutzt ( $D_{V, 1-5} - D_H$  bzw.  $D_{N, 1-5} - D_H$ ).

Als zweite Methode zur Bestimmung des FRET wurde das *sensitized emission* verwendet. Dieses beinhaltet die Aufnahme eines Drei-Kanal-Bildes des zu messenden Bereiches. Neben den Kanälen für Donor und Akzeptor wird außerdem ein FRET-Kanal hinzugefügt. In diesem erfolgt die Anregung des Donors, aber die Messung des Akzeptors. Je größer die FRET-Effizienz ist, desto stärker ist auch die gemessene Intensität des Akzeptors. Da die Spektren der meisten für FRET-Messungen genutzten Chromophoren mehr als die gewünschte Überlappung von Donor-Emission und Akzeptor-Absorption zeigen, ist die FRET-Effizienz hinsichtlich der sog. *bleed-through*-Effekte zu normalisieren. Eine solche unerwünschte Überlappung stellt beispielsweise jene des ECFP-Emissionsbereichs mit dem des EYFP dar. Dies führt dazu, dass ein geringer Teil der Emissionsstrahlung des ECFP auch in Abwesenheit eines Akzeptors im FRET-Kanal gemessen werden kann und so zu einem falsch-positiven Messwert für FRET führt. Die Berechnung des normalisierten FRET ( $nF$ ) erfolgt durch Messung der Intensitäten in der ROI für den FRET-Kanal ( $F_f$ ), den Donor-Kanal ( $D_f$ ) und den Akzeptor-Kanal ( $A_f$ ) (Formel 5). Dabei erfolgt im FRET-Kanal die Anregung des Donors und die Messung des Akzeptors, im Donor-Kanal die Anregung und Messung des Donors und im Akzeptor-Kanal die Anregung und Messung des Akzeptors. Die Korrekturfaktoren  $a$  (Donor-*bleed-through*) und  $b$  (Akzeptor-*bleed-through*) lassen sich parallel anhand von Drei-Kanal-Bildern für Donor- bzw. Akzeptoreinzelproben berechnen. Diese wägen den *bleed-through* der Einzelproben in den FRET-Kanal ab (Formeln 6 und 7). Weiterhin wird bei der Berechnungsmethode nach Xia ( $N_{FRET}$ , N-FRET) das Verhältnis der Donor- und Akzeptorkonzentrationen berücksichtigt (Formel 8). Deren Ungleichgewicht (ideal 1 zu 1) würde zu einer konzentrationsabhängigen Verzerrung der FRET-Effizienz führen. Die Berücksichtigung steigert daher die Vergleichbarkeit der Messwerte zwischen verschiedenen Zellen und Experimenten (Xia und Liu 2001).

$$nF = F_f - D_f \cdot a - A_f \cdot b \quad (5)$$

$$a = \frac{F_d}{D_d} \quad (6)$$

$$b = \frac{F_a}{A_a} \quad (7)$$

$$N_{FRET} = \frac{F_f - D_f \cdot a - A_f \cdot b}{\sqrt{D_f \cdot A_f}} \quad (8)$$



### **2.3 Generierung und Darstellung von 3D-Strukturmodellen**

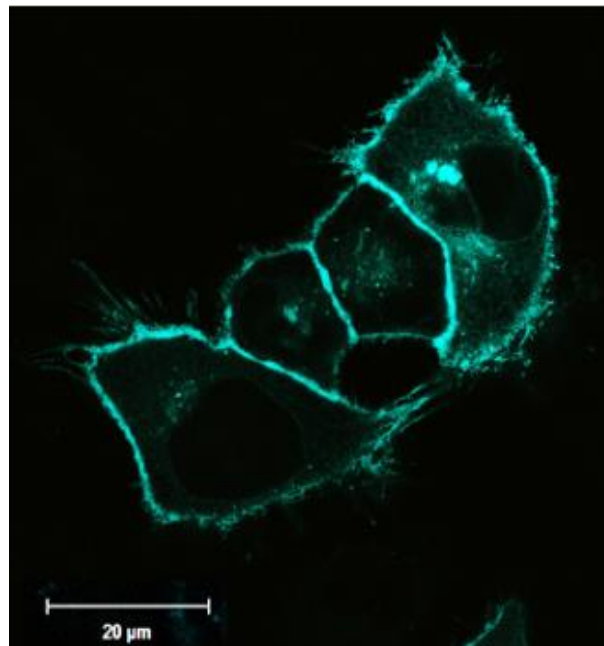
Die gezeigten 3D-Strukturmodelle wurden mithilfe des Online-Tools Phyre2 erstellt (Kelley et al. 2015). Hier werden aus den eingegebenen Aminosäuresequenzen *Hidden Markov Models* (HMM) errechnet. Diese werden mit einer Datenbank aus bekannten HMM abgeglichen, was der Erstellung einer ersten Grundstruktur dient. Die Grundstruktur wird bei der weiteren Prozessierung zum finalen Modell aufgearbeitet. Die Darstellung dieser Modelle erfolgt mit dem Programm UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004). Neben der bloßen Darstellung bietet dieses auch die Möglichkeit, die Strukturen einzufärben und bestimmte Strukturen für eine bessere Übersicht auszublenden.

## 3 Ergebnisse

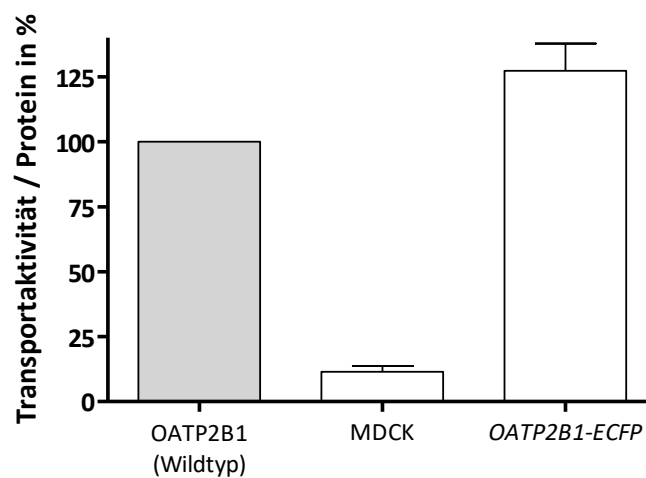
### 3.1 Generierung von FRET-Fusionsvektoren

Primäres Ziel der Generierung der FRET-Fusionsvektoren war die Integration zweier zum Förster-Resonanzenergietransfer befähigter Fluorophore in das OATP2B1. Hierzu wurden die FRET Paare ECFP-EYFP sowie ECFP-FIAsH (bzw. das Tetracystein-Motiv (TC) als Bindungsstelle für FIAsH) eingesetzt. Zur Kontrolle wurden für beide Paare direkte Fusionsproteine ECFP-EYFP bzw. ECFP-FIAsH (ohne OATP2B1) generiert, wobei der *pECFP-N1*-Vektor als Ausgangspunkt verwendet wurde. Grundlage aller zur FRET-Messung eingesetzter OATP2B1-Konstrukte war das *OATP2B1-ECFP* (ebenfalls im *pECFP-N1*-Vektor). Dieses besteht aus dem OATP2B1 (ohne Stopcodon), das über eine kurze Verbindung (57 Basen) aus der Multiple Cloning Site (MCS) des *pECFP-N1*-Vektors C-terminal mit dem ECFP verbunden wurde (vgl. 2.2.2.1). Analog zu den Untersuchungen an den FRET-Konstrukten (ab Kapitel 3.3) wurde das *OATP2B1-ECFP* zunächst hinsichtlich seiner Lokalisation und Funktion charakterisiert. Hierzu wurden HeLa- (Lokalisation) und MDCKII-Zellen (Funktion) zunächst transient transfiziert. Die Lokalisation wurde mittels Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht, während zur Beurteilung der Funktion die Aufnahme des OATP2B1-Modellsubstrats Estron-3-sulfat bestimmt wurde. Hierbei zeigte sich eine plasmamembranständige Lokalisation (vgl. Abbildung 10) sowie eine dem Wildtyp-OATP2B1 vergleichbare Aufnahme des Tritium-markierten Substrats Estron-3-sulfat ( $E_1S$ ; vgl. Diagramm 1). Das Ergebnis der Sequenzierung befindet sich im Anhang.

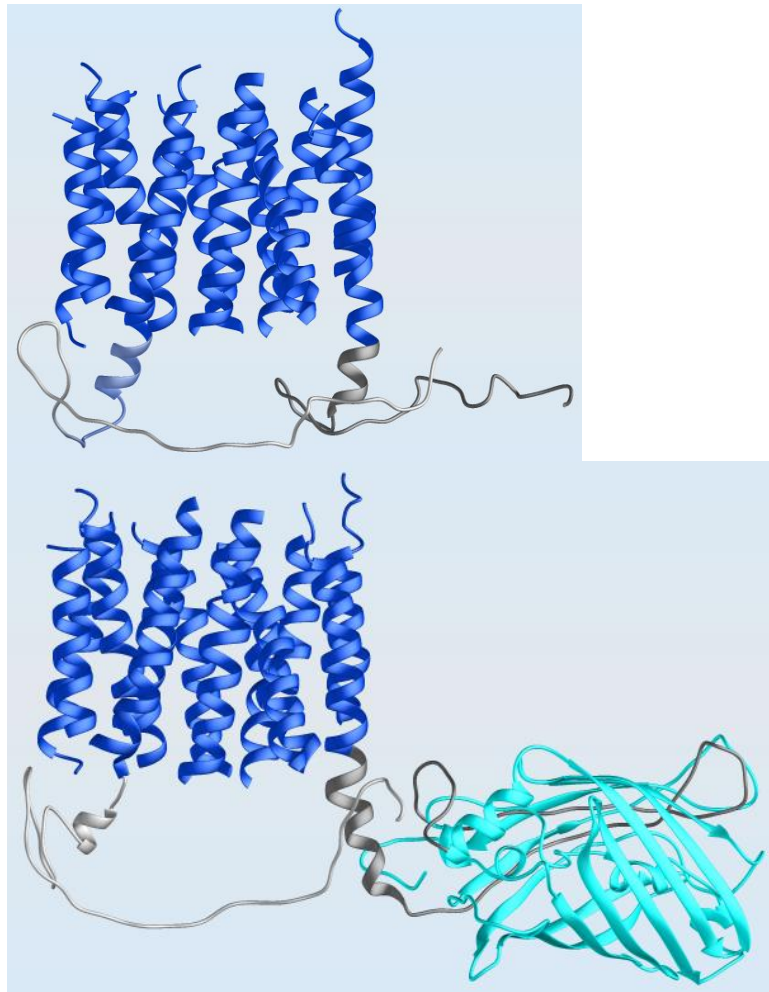
Für das Wildtyp-OATP2B1 und dieses erste Fusionsprotein wurden außerdem mittels Phyre2 (Kelley et al. 2015) und USCF Chimera (Pettersen et al. 2004) 3D-Modelle generiert, welche die postulierten 12 TMD des OATP2B1 sowie die Faltung des ECFP zeigen (vgl. Abbildung 11).



**Abbildung 10: Lokalisation des *OATP2B1-ECFP* in HeLa-Zellen.** Neben wenigen intrazellulären Proteinaggregaten befindet sich der Großteil der exprimierten Proteine in den Plasmamembranen der Zellen. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) im ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm).



**Diagramm 1: Darstellung der Transportaktivität des *OATP2B1-ECFP*.** Gezeigt ist die Aufnahme von Tritium-markiertem Est-ron-3-sulfat ( $E_3S$ , 5 nM) in transient transfizierten MDCKII-Zellen über eine Dauer von 5 min. Die bestimmte Aktivität ist auf den Gesamtproteingehalt bezogen und prozentual dargestellt, wobei das Wildtyp-OATP2B1 als 100 % normiert ist. (Mittelwerte + SD, n = 2 bzw. n = 3 für *OATP2B1-ECFP*)



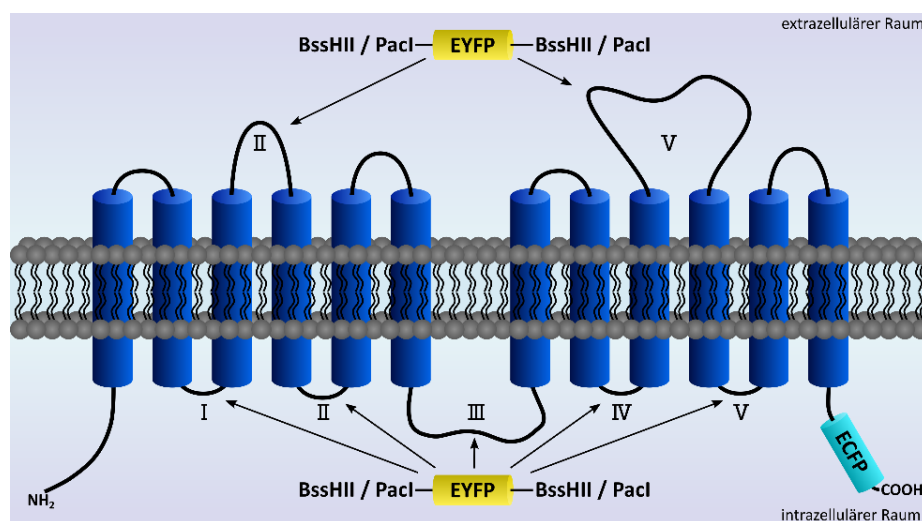
**Abbildung 11: Simuliertes 3D-Proteinmodell vom Wildtyp-OATP2B1 und OATP2B1-ECFP.** Simulation mittels Phyre2 (Kelley et al. 2015) und Darstellung in UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004). Oben: Wildtyp-OATP2B1, unten: OATP2B1-ECFP. Die 12 TMD sind blau gefärbt, der N-Terminus hellgrau, der C-Terminus sowie die aus neun Aminosäuren bestehende Verbindung zum ECFP dunkelgrau und das ECFP cyan. Intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen sind der Übersicht halber nicht dargestellt.

### 3.1.1 EYFP-OATP2B1-ECFP-Vektoren

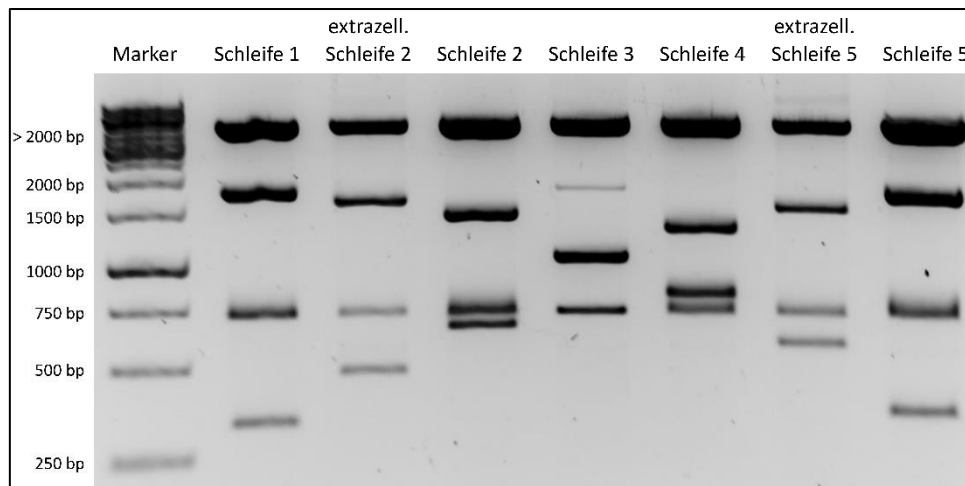
Als ersten der geplanten zwei FRET-Partner zum ECFP wurde das EYFP in den OATP2B1-ECFP-Vektor eingefügt. Hierzu wurde die EYFP-Nukleotidsequenz an ihren 5'- und 3'-Enden mit den Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen BssHII und PacI ausgestattet. Dies diente der Integration der EYFP-Sequenz in die OATP2B1-ECFP-Sequenz an Positionen, die ebenfalls über gezielte Mutagenese mit den Erkennungssequenzen ausgestattet wurden (vgl. 2.2.2.2). Die Integration erfolgte in den fünf intrazellulären Schleifen sowie in der zweiten und fünften extrazellulären Schleife (vgl. Abbildung 12). Die Mutagenesestellen wurden dabei im Bereich der Schleife so gewählt, dass möglichst wenige Nukleotide ausgetauscht werden mussten, bzw. die Aminosäuresequenz erhalten wurde. Tabelle 10 listet die durchgeführten Mutagenesen auf. Abbildung 13 zeigt den Kontrollverdau, der zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung durchgeführt wurde.

Tabelle 10: Mutagenesestellen zur Integration des EYFP in das *OATP2B1-ECFP*.

Bezeichnung	Position	ursprüngliche Sequenz (5'-3')	mutierte Sequenz (5'-3')
<i>S1-EYFP-OATP2B1-ECFP</i>	c.331-336 1. IZS	CGGGTG	GCGCGC
<i>EZS2-EYFP-OATP2B1-ECFP</i>	c.484-489 2. EZS	CTGCCC	GCGCGC
<i>S2-EYFP-OATP2B1-ECFP</i>	c.658-663 2. IZS	AACAGC	GCGCGC
<i>S3-EYFP-OATP2B1-ECFP</i>	c.1066-1073 3. IZS	TTCATTAA	TTAATTAA
<i>S4-EYFP-OATP2B1-ECFP</i>	c.1309-1314 4. IZS	CTGGGC	GCGCGC
<i>EZS5-EYFP-OATP2B1-ECFP</i>	c.1516-1521 5. EZS	CCCAGC	GCGCGC
<i>S5-EYFP-OATP2B1-ECFP</i>	c.1768-1773 5. IZS	GTGAAG	GCGCGC



**Abbildung 12: Sekundärstruktur des *OATP2B1-ECFP* mit den Integrationsstellen für EYFP.** Die mit den Erkennungssequenzen für BssHII bzw. PacI ausgestattete EYFP-Sequenz wurde in die IZS 1 – 5 sowie in die EZS 2 und 5 integriert. Diese wurden dafür mittels gezielter Mutagenese ebenfalls mit den Erkennungssequenzen ausgestattet. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht hinsichtlich der Größen vom OATP2B1 und ECFP bzw. EYFP. Einen besseren Vergleich liefern die Abbildung 11 und die Abbildungen in Abschnitt 3.3.3.



**Abbildung 13: Restriktionsverdau der hergestellten *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Vektoren.** UV-Licht-Aufnahme im Agarosegel (1 %). Restriktion mit den Enzymen *Xho*I, *Hind*III sowie *Bss*HII (bzw. *Pac*I für Schleife 3). Links: 1 kb-Marker. Soweit nicht anders bezeichnet, handelt es sich um die intrazellulären Schleifen. Die Banden bei 750 bp stellen die EYFP-Sequenz dar. Die obere Bande stellt jeweils den ECFP-N1-Vektor dar (4700 bp). Die übrigen Banden sind in ihrer Größe etwa analog zu den in Tabelle 10 bezeichneten Positionen der Mutagenesestellen, für jede Schleife zusammengesetzt aus c.1 – c.X bzw. c.X – c.2127.

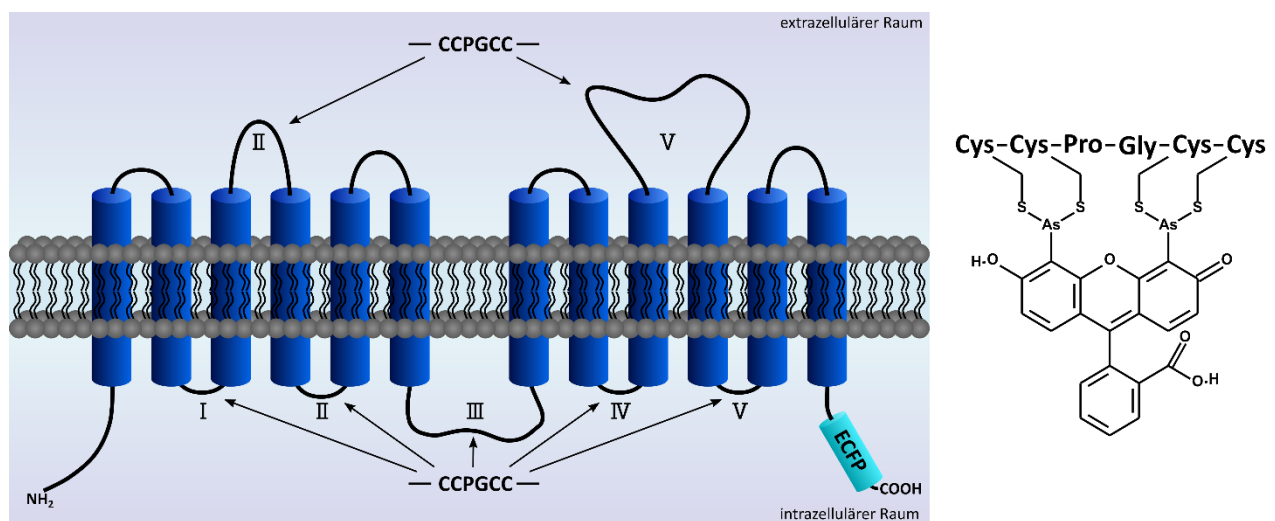
### 3.1.2 *FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Vektoren

Um *FIAsH* als zweiten FRET-Partner für das ECFP nutzen zu können, muss dieses zuvor an einer spezifischen Aminosäure-Sequenz, dem Tetracystein-Motiv (CCPGCC), des Proteins binden (vgl. Abbildung 14). Auf Nukleotidebene wurden dazu Mutagenesen in der 2. – 5. IZS sowie der 2. und 5. EZS des *OATP2B1-ECFP* durchgeführt, die zum Ziel hatten die entsprechenden Codons der Aminosäuren einzubringen (vgl. 2.2.2.3). Für die erste IZS war dies ebenfalls geplant, die Mutagenese letztlich aber nicht erfolgreich. Die Mutagenesestellen wurden auch hier weitgehend willkürlich gewählt. Wie bei bisherigen Mutagenesen wurde wiederum versucht, dass möglichst wenige Nukleotide ausgetauscht werden mussten, bzw. die Aminosäuresequenz erhalten wurde. Tabelle 11 gibt eine Übersicht der Positionen, an denen die Mutagenesen durchgeführt wurden. Die zur Kontrolle durchgeführten Sequenzierungen der einzelnen Positionen befinden sich im Anhang.

**Tabelle 11: Mutagenesestellen zur Integration des TC-Motivs in das *OATP2B1-ECFP*.**

Bezeichnung	Position	ursprüngliche Sequenz (5'-3')	mutierte Sequenz (5'-3')
<i>EZS2-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i>	c.481-498	TGC CTG CCC	TGC TGT CCC
	2. EZS	ACA ACC TCG	GGA TGC TGT
<i>S2-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i>	c.649-666	TTT GCC CAC	TGT TGC CCC
	2. IZS	AAC AGC AAC	GGC TGC TGC
<i>S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i>	c.994-1011	CAG AGC CCT	TGT TGT CCT
	3. IZS	GGG GAG TCC	GGG TGT TGT

Bezeichnung	Position	ursprüngliche Sequenz (5'-3')	mutierte Sequenz (5'-3')
<i>S4-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i>	c.1300-1317	CGG CTC CAC	TGT TGC CCC
	4. IZS	CTG GGC CCT	GGG TGC TGT
<i>EZS5-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i>	c.1546-1563	TGC CAC GCA	TGC TGC CCA
	5. EZS	GGC TGC TCA	GGC TGC TGC
<i>S5-FIAsH-OATP2B1-ECFP</i>	c.1765-1782	GGA GTG AAG	TGT TGT CCG
	5. IZS	AAA GAA GAC	GGA TGT TGC

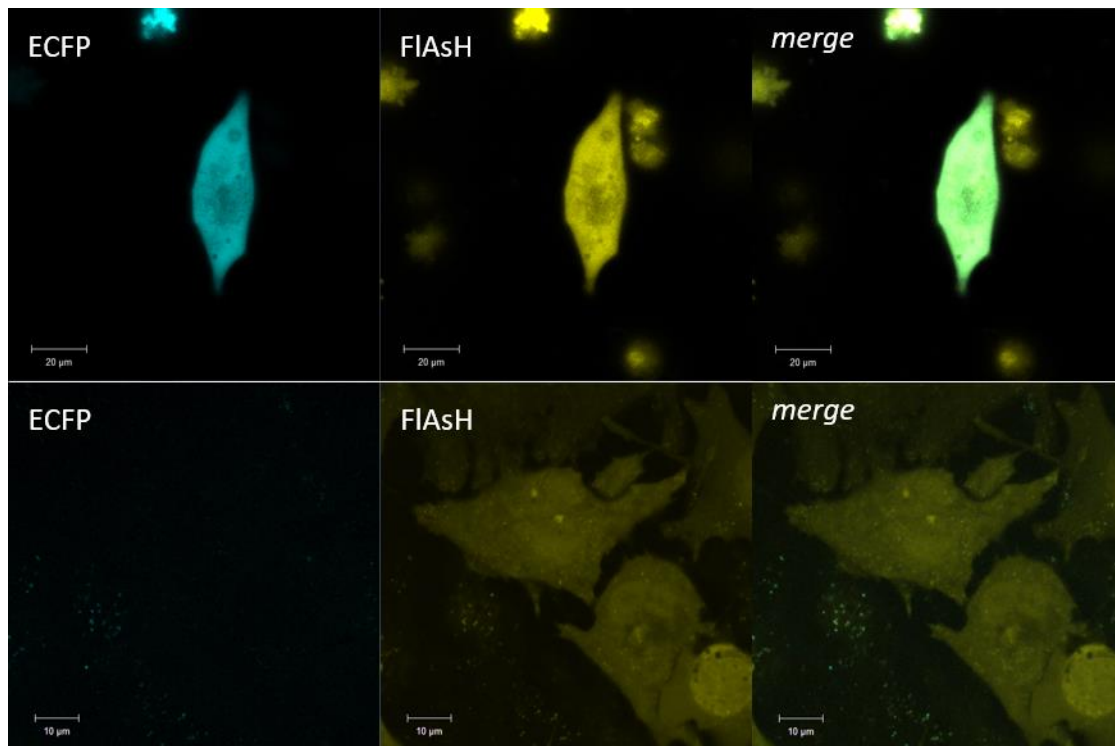


**Abbildung 14: Sekundärstruktur OATP2B1-ECFP mit Mutagenesestellen für das TC-Motiv.** Die zur Bindung des FIAsH-EDT<sub>2</sub> nötige Bindestelle wurde in die IZS 2 – 5 sowie in die EZS 2 und 5 integriert. Die gezeigte Integration in die 1. IZS war nicht erfolgreich. Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht hinsichtlich der Größen vom OATP2B1 und ECFP. Einen besseren Vergleich liefern die Abbildung 11 und die Abbildungen in Abschnitt 3.4.4. Rechts: Darstellung des gebundenen FIAsH-EDT<sub>2</sub> an das TC-Motiv über Schwefel-Arsen-Bindungen.

### 3.1.3 FIAsH-Kontrollvektoren

Als FRET-Kontrollvektoren für die FRET-Partner FIAsH und ECFP wurde das TC-Motiv in den *pECFP-N1*-Vektor integriert. Dies erfolgte einmal unter Beibehaltung des ECFP (*FIAsH-ECFP*-Fusionsvektor) sowie ein weiteres Mal mit Entfernung des ECFP (*FIAsH-Positivkontrolle*) (vgl. 2.2.2.4). Der *FIAsH-ECFP*-Fusionsvektor besteht aus einem Fragment von 39 Nukleotiden mit dem TC-Motiv, das über eine kurze Verbindung aus weiteren 39 Nukleotiden aus der MCS des *pECFP-N1*-Vektors C-terminal mit dem ECFP verbunden ist. Die räumliche Nähe beider Fluorophore im gebildeten Protein sollte ein FRET-Signal ermöglichen, weshalb es als FRET-Positivkontrolle für dieses FRET-Paar vorgesehen war. Daneben sollte die *FIAsH-Positivkontrolle* zusammen mit dem *pEYFP*-Vektor als FRET-Negativkontrolle für das FRET-Paar fungieren. Die

*FIAsH-Positivkontrolle* besteht lediglich aus dem Fragment aus 39 Nukleotiden und dem enthaltenen TC-Motiv innerhalb des *pECFP-N1*-Vektors ohne das ECFP. Abbildung 15 zeigt die Expression beider Vektoren in HeLa-Zellen.



**Abbildung 15: Expression der FIAsH-Kontrollvektoren in HeLa-Zellen.** Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Oben: *FIAsH-ECFP*-Fusionsvektor. Unten: *FIAsH-Positivkontrolle*. Beide Proteine sind im gesamten Zytoplasma exprimiert.

## 3.2 Etablierung der FRET-Messungen

### 3.2.1 Zellmodell und Transfektionsbedingungen

Die FRET-Messungen wurden in lebenden Zellen in 8-well-Kammerdeckgläsern durchgeführt. Daher galt es zu Beginn geeignete Zellen zu wählen. Zur Auswahl standen dabei MDCKII und HeLa-Zellen. Hinsichtlich der Lokalisation der getesteten Vektoren war für beide Zelllinien kein Unterschied festzustellen. Das wesentliche Entscheidungskriterium war daher das Verhalten der Zellen nach der transienten Transfektion. Hier erwiesen sich die HeLa-Zellen als nachteilig, da sie bereits 24 h nach Transfektion (mit 1 µL *Lipofectamin 2000*) ein vermehrtes Absterben zeigten. Aus diesem Grund wurden mit Ausnahme einiger Vorversuche sämtliche mit den FRET-Vektoren assoziierten Versuche (FRET-Messungen, Transporterassays) mit MDCKII-Zellen durchgeführt. Als optimales Transfektionsgemisch pro Well zeigte sich 1 µL *Lipofectamin 2000* mit 500 ng Vektor-DNA in 25 µL *Opti-MEM*. Auf eine Darstellung der durchgeführten

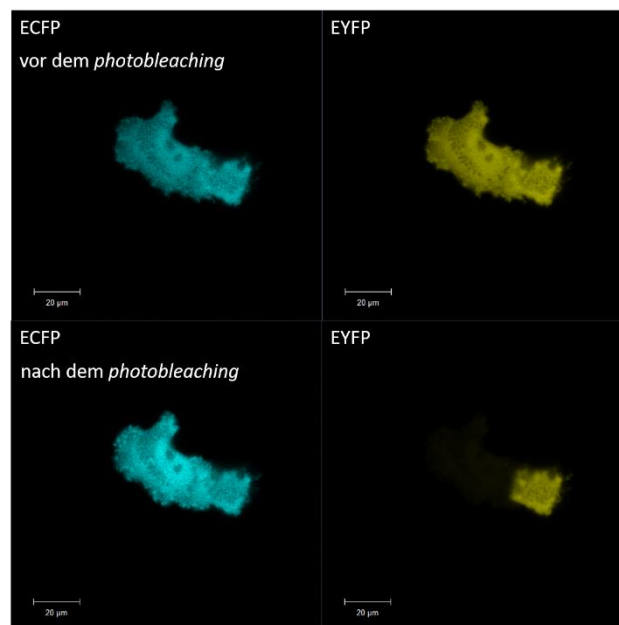


Konzentrationsreihen wird verzichtet, da keine Quantifizierung stattfand und ihre Bewertung weitgehend subjektiv erfolgte. Zusammenfassend war festzustellen, dass eine Erhöhung des *Lipofectamin*-Gehalts über 1  $\mu$ L keine nennenswerte Steigerung der Transfektionsrate bewirkte. Die DNA-Menge war daneben vor allem von der Größe des zu exprimierenden Konstruktes abhängig. Hierbei waren vor allem für die großen Konstrukte (*EYFP-OATP2B1-ECFP*-Vektoren) 500 ng nötig, während die FRET-Kontrollvektoren auch bei wesentlich geringeren Mengen (100 ng) ausreichend exprimiert wurden.

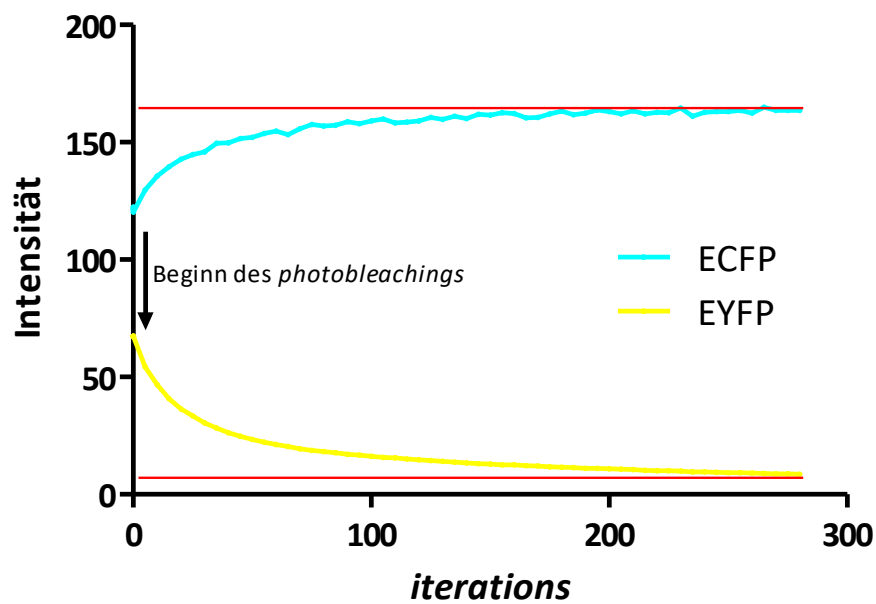
### 3.2.2 Etablierung der FRET-Messung via *photobleaching*

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Messmethode für FRET war das Akzeptor-*photobleaching*. Bei der Etablierung der Methode wurde im Wesentlichen nach dem Protokoll von Robinson et al. (2001) verfahren. Es wurden jedoch spezifische Anpassungen für die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore vorgenommen. Kritisch war hierbei vor allem das Bleichen des Akzeptors. Da zur Messung mittels *photobleaching* eine möglichst vollständige Zerstörung des fluorophoren Systems des Akzeptors angestrebt wird, muss das Bleichen über eine bestimmte Zeit erfolgen. Da in lebenden Zellen gemessen wurde, tritt dabei die Bewegung der Zellen zeitkritisch in Kraft. Deshalb musste die Zahl der *iterations* (Wiederholungen) des Bleichens so gewählt werden, dass zwar der Akzeptor ausreichend ausgebleicht, die Messung aber nicht schwerwiegend durch Zellbewegungen verfälscht wurde. Zu diesem Zweck wurde die *ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle* genutzt, um die optimale Anzahl an *iterations* zu ermitteln. Es wurden Zeitreihen aufgenommen, bei der nach anfänglichen vier Bildern ohne Bleichen nach jedem aufgenommenen Bild mit 5 *iterations* gebleicht wurde. Das Ergebnis einer dieser Zeitreihen ist beispielhaft im Diagramm 2 dargestellt. Daneben zeigt Abbildung 16 eine HeLa-Zelle vor und nach dem *photobleaching*. Es zeigte sich, dass das EYFP auch nach über 250 *iterations* noch immer nicht vollständig ausgebleicht war. Gleichzeitig schien auch das ECFP erst spät sein Maximum zu erreichen. Zur praktischen Bewertung der Kurvenverläufe sind die prozentualen Veränderungen nach jedem Bleichschritt in Diagramm 3 dargestellt. Deutlicher als in Diagramm 2 zeigt sich hier, dass es bereits unter 100 *iterations* zu einem ersten Wiederabfall der ECFP-Intensität kommt. Da parallel dazu die EYFP-Intensität kontinuierlich abnimmt, ist davon auszugehen, dass dieser Abfall nicht durch eine Wiederherstellung von EYFP bedingt ist. Spätestens nach 100 *iterations* ist kein eindeutiger Unterschied mehr zwischen Zu- und Abnahme zu erkennen. Daher wurden 100 *iterations* als Optimum für die *photobleaching*-Messungen gewählt. Zur Sicherstellung wurde die FRET-Positivkontrolle im

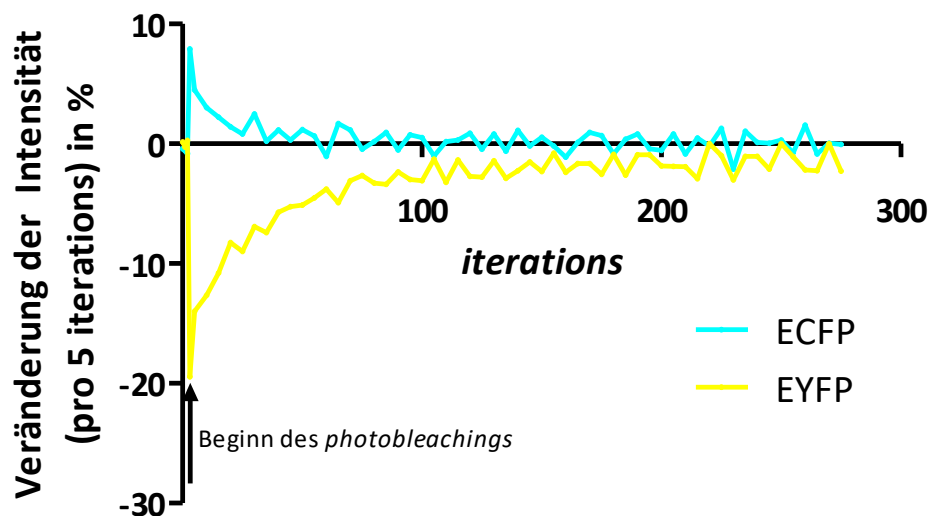
Rahmen der FRET-Kontrollmessungen auch testweise mit 200 *iterations* vermessen. Es zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der FRET-Effizienz. Diagramm 4 zeigt diese Messung sowie alle mit der *photobleaching*-Methode vermessenen Kontrollvektoren, darunter der einzelne *pECFP-N1*-Vektor sowie die FRET-Positiv- und Negativkontrollen für ECFP/EYFP und ECFP/FlAsH. Dabei wurde als FRET-Positivkontrolle für ECFP/EYFP der Vektor *ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle* und als Negativkontrolle eine Doppeltransfektion mit den Vektoren *pECFP-N1* und *pEYFP-N1* verwendet. Für das FRET-Paar ECFP/FlAsH bestand die Positivkontrolle aus dem *FlAsH-ECFP*-Fusionsvektor und die Negativkontrolle aus einer Doppeltransfektion mit den Vektoren *pECFP-N1* sowie *FlAsH-Positivkontrolle*. Der *pECFP-N1*-Vektor diente der Feststellung des allgemeinen Grundrauschens. Die FRET-Effizienz für die Negativkontrollen lag etwa bei 0 % (ECFP/EYFP:  $-0,44 \% \pm 1,6$ ; ECFP/FlAsH:  $0,18 \% \pm 1,81$  [Mittelwert  $\pm$  SD]). Die FRET-Effizienz für die ECFP-EYFP-Positivkontrolle lag bei  $21,11 \% (\pm 3,42)$ , die der ECFP-FlAsH-Positivkontrolle bei  $14,69 \% (\pm 5,16)$ . Der *pECFP-N1*-Vektor zeigte  $0,82 \% (\pm 0,55)$ . Die angewendete Methode erfüllte damit die Erwartungen an die FRET-Kontrollvektoren.



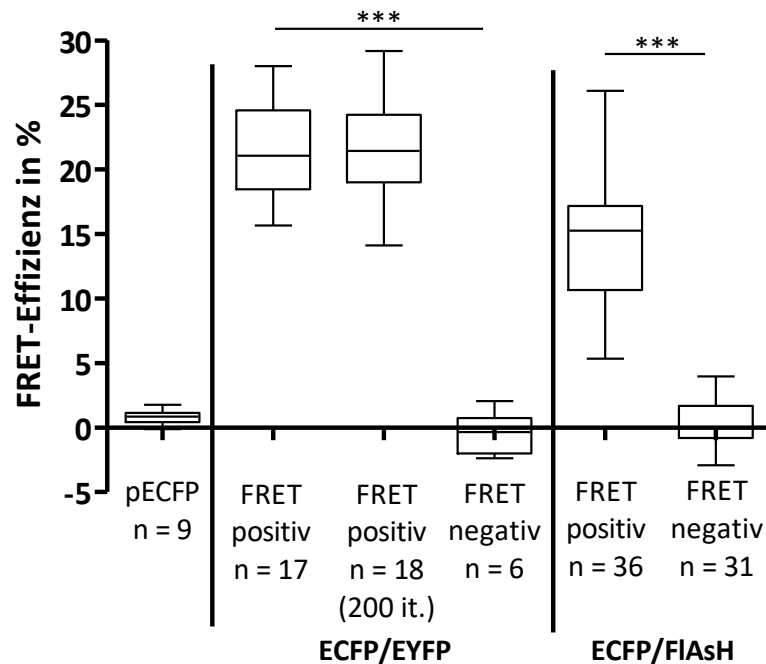
**Abbildung 16: Photobleaching der ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle in einer HeLa-Zelle.** Die Zelle ist jeweils vor Beginn der in Diagramm 2 dargestellten Zeitreihe sowie danach dargestellt. Die Zunahme der ECFP-Intensität ist mit bloßem Auge ersichtlich. Bei genauerer Betrachtung fällt außerdem auf, dass sich die Zelle an einigen Stellen um wenige  $\mu\text{m}$  ausgedehnt hat. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



**Diagramm 2: Photobleaching der FRET-Positivkontrolle in Abhängigkeit zu den iterations.** Das Diagramm zeigt die Intensitäten von ECFP und EYFP in der *ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle* während des wiederholten Bleichens mit jeweils 5 iterations (514 nm, 100 %). Das Bleichen beginnt nach vier Aufnahmen (Pfeil). Es kommt sofort zu einer Abnahme der EYFP-Intensität und parallel zum Anstieg der ECFP-Intensität. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).

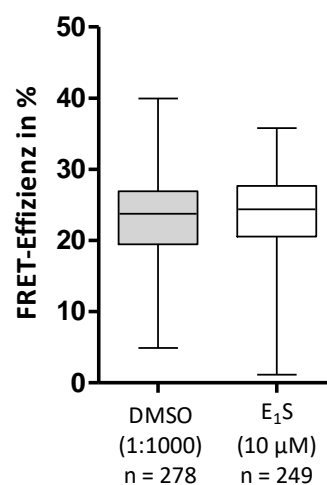


**Diagramm 3: Prozentualer Verlauf beim Bleichen der FRET-Positivkontrolle.** Das Diagramm zeigt die prozentuale Entwicklung der Intensitäten von ECFP und EYFP in der *ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle* während des wiederholten Bleichens nach jeweils 5 iterations. Das Bleichen beginnt nach vier Aufnahmen (Pfeil). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



**Diagramm 4: FRET-Effizienzen der FRET-Kontrollvektoren nach Akzeptor-*photobleaching*.** Die FRET-Effizienzen sind jeweils kategorisiert nach den FRET-Partnern, wobei für ECFP/EYFP eine zusätzliche Aufnahme mit 200 *iterations* für die Positivkontrolle vorgenommen wurde. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP bzw. FlAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau:  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

Zusätzlich wurde für die *ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle* eine Vergleichsmessung mit IP zzgl. DMSO (1:1000) bzw.  $E_1S$  (10  $\mu M$ ) durchgeführt. Dies sollte sicherstellen, dass die FRET-Messungen nicht durch optische Eigenschaften der verwendeten Substanzen beeinflusst werden. Wie in Diagramm 5 dargestellt, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Messungen festgestellt werden (DMSO: 23,05 %  $\pm$  5,870;  $E_1S$ : 23,09 %  $\pm$  6,806 [Mittelwert  $\pm$  SD]).

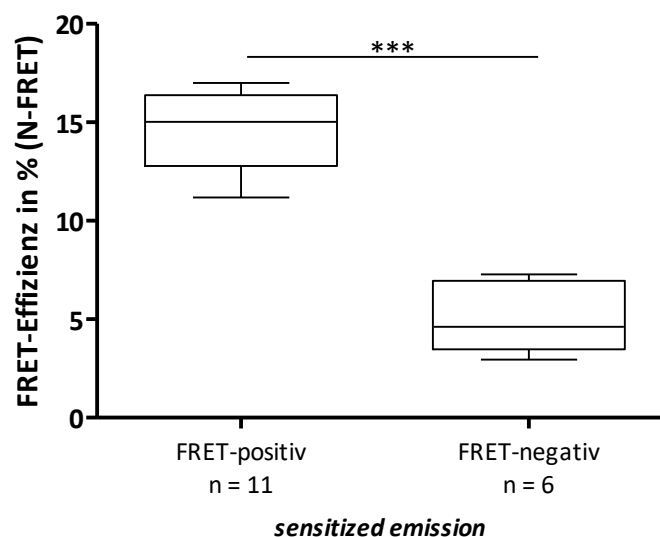


**Diagramm 5: FRET-Effizienzen der *ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle* unter Substanzgabe.** Die FRET-Messung erfolgte mittels *photobleaching* in MDCKII-Zellen. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), kein signifikanter Unterschied feststellbar ( $p < 0,05$ ).

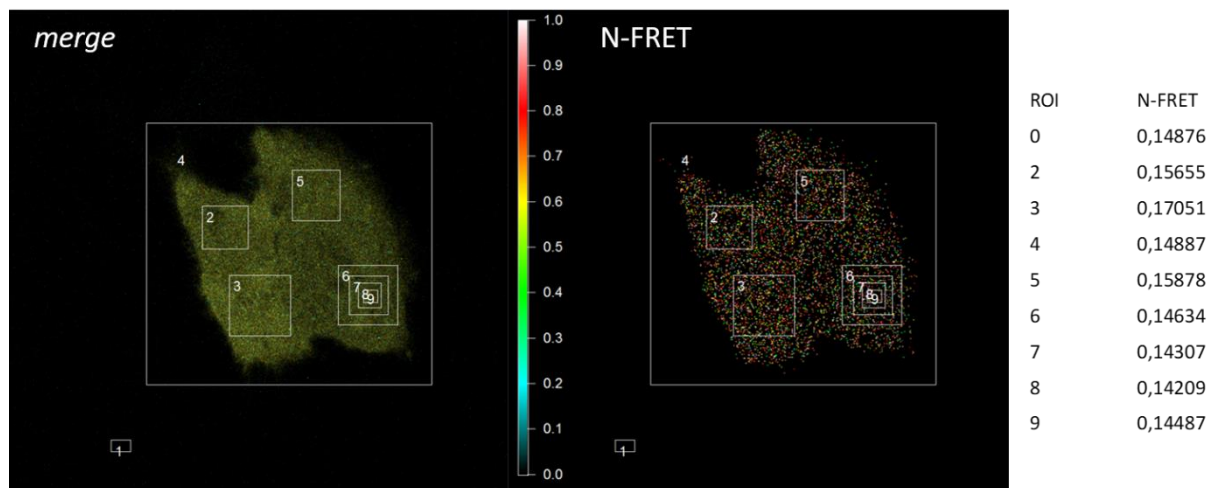
### 3.2.3 Etablierung der FRET-Messung via *sensitized emission*

Da die Durchführung der Messmethode *sensitized emission* im Wesentlichen durch die Betriebssoftware des LSM 780 vorgegeben war, wurde bei der Etablierung lediglich ein Augenmerk auf die Größe der zu setzenden ROI gelegt. Aufgrund der manuellen Setzung der ROI waren diese der potenziell fehleranfälligste Parameter. Zur Testung der ROI-Größe wurde die *ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle* vermessen, wobei ROI unterschiedlicher Größe im selben Bereich der Zelle platziert wurden. Die Ergebnisse sind beispielhaft in Abbildung 17 wiedergegeben. Es zeigte sich, dass die Größe der ROI (ROI 6 – 9) kaum einen Einfluss auf die FRET-Effizienz hatte. Die Werte schwanken ohne Tendenz von 14,X bis 14,Y %. Größere Unterschiede von fast bis zu 3 % waren dagegen aufgrund der Platzierung aufgetreten (ROI 3 vs. 6). Um diese zu umgehen, wurden die ROI daher nicht einzeln in der Zelle platziert, sondern immer große Areale einzelner Zellen oder ihrer Kompartimente (Zellmembranen) umfasst, wie es auch beim *photobleaching* erfolgte.

Auf diese Weise wurden wiederum zunächst die FRET-Kontrollvektoren vermessen. Hier zeigten sich wie im Diagramm 6 gezeigt FRET-Effizienzen (N-FRET) von 14,67 % ( $\pm 1,99$ ) für den Vektor *ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle* und 4,99 % ( $\pm 1,814$ ) für die Vektorpaarung *pECFP-N1* und *pEYFP-N1*. Die FRET-Effizienz für die Positivkontrolle ist damit geringer als der durch *photobleaching* erhobene Wert (21,11 %) und die für die Negativkontrolle höher (0,438 %).



**Diagramm 6: FRET-Effizienzen (N-FRET) der ECFP/EYFP-FRET-Kontrollvektoren.** Die Aufnahme in MDCKII-Zellen erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Drei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm), EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm) und FRET-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau:  $p < 0,001$  (\*\*\*).



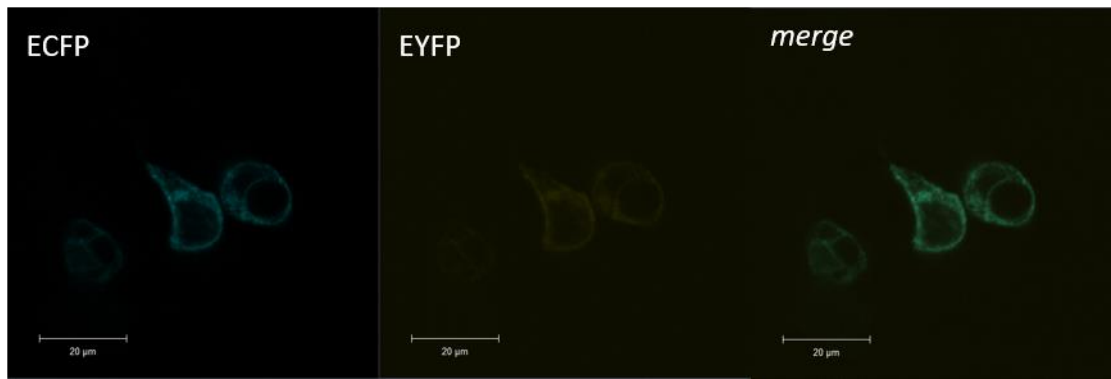
**Abbildung 17: Sensitized emission am Beispiel der ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle.** Gezeigt ist die *merge*-Darstellung sowie das daraus berechnete FRET-Bild für N-FRET von MDCKII-Zellen. Die Tabelle rechts gibt die einzelnen N-FRET-Werte für jede ROI wieder. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Drei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm), EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm) und FRET-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 515 – 646 nm).

### 3.3 Charakterisierung der *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine

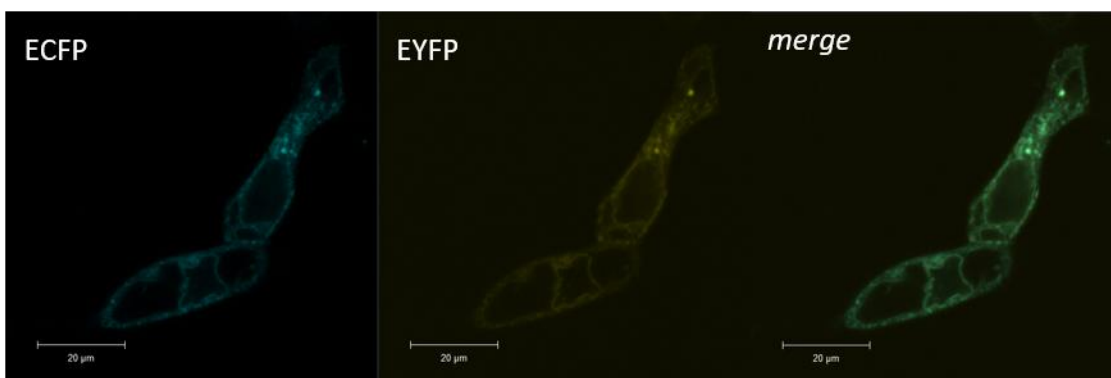
Nach der Etablierung der FRET-Methoden galt es die hergestellten *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine zu charakterisieren. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die weitere Modifikation des *OATP2B1-ECFP* zu Beeinträchtigungen seiner Funktion führen würde, wurde hierbei nicht nur die FRET-Effizienz erfasst, sondern auch die Lokalisation und Transportaktivität der Konstrukte überprüft. Außerdem wurde für jedes Konstrukt ein 3D-Modell erstellt, mit deren Hilfe die Abstände innerhalb des Moleküls ausgemessen werden konnten. Diese dienten als Vergleich zu den über die FRET-Daten erhobenen Abständen.

#### 3.3.1 Lokalisation

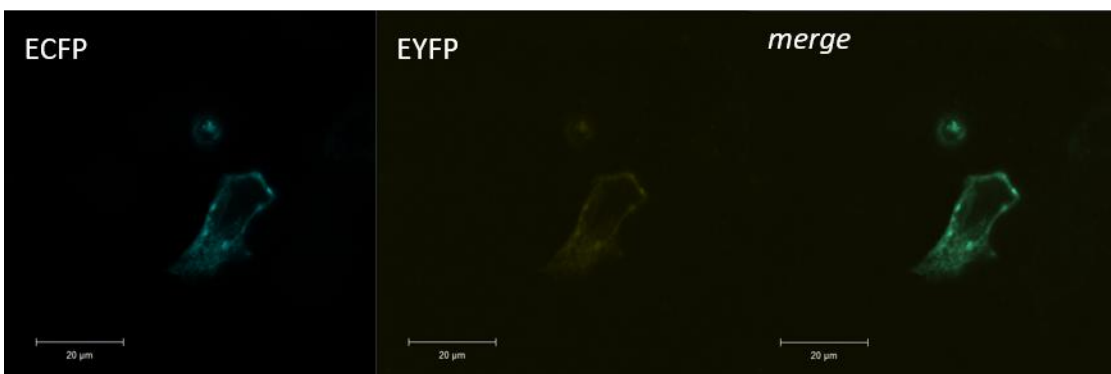
Um festzustellen, ob die hergestellten Fusionsproteine exprimiert und analog zum *OATP2B1-ECFP* in die Plasmamembran sortiert werden, wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen erstellt. Dabei war festzustellen, dass bis auf das Konstrukt *EZS5-EYFP-OATP2B1-ECFP* alle Fusionsproteine exprimiert werden. Im Folgenden sind zunächst die Aufnahmen der Konstrukte *S1-* bis *S5-EYFP-OATP2B1-ECFP* gezeigt, im Anschluss die des Konstruktes *EZS2-EYFP-OATP2B1-ECFP*. Die Beschreibung der Lokalisation befindet sich jeweils in der Bildunterschrift.



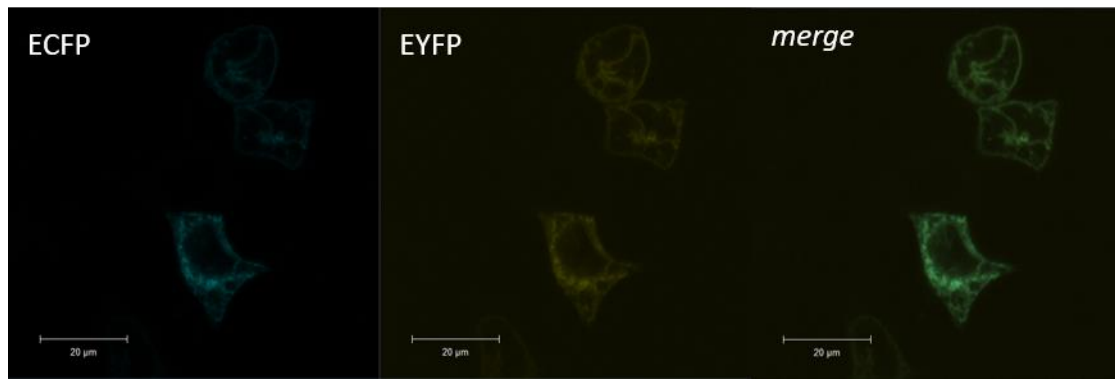
**Abbildung 18: Lokalisation des *S1-EYFP-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein ist vor allem in der Zellmembran zu finden. Daneben tritt es auch intrazellulär auf. In der rechten Zelle ist es außerdem in der Kernmembran zu erkennen. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



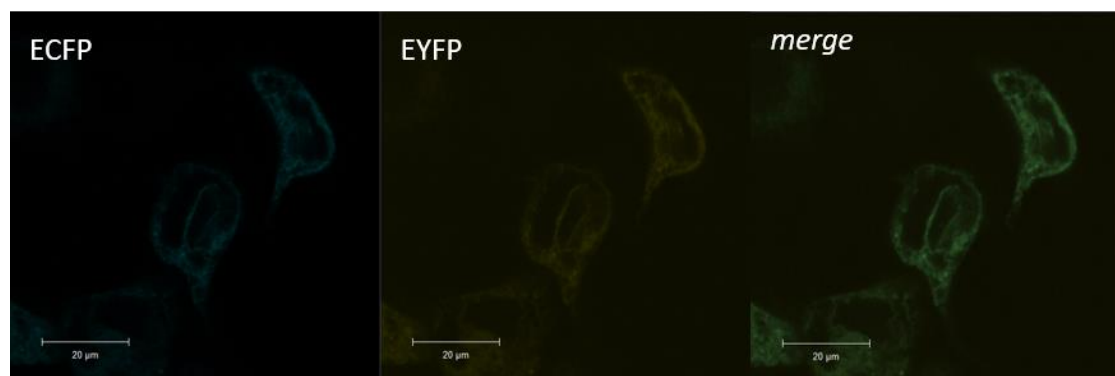
**Abbildung 19: Lokalisation des *S2-EYFP-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein befindet sich bei beiden Zellen in der Zellmembran. Zusätzlich ist es bei beiden in intrazellulären Membranen exprimiert, wobei insbesondere bei der linken Zelle nicht ganz eindeutig ist, ob es sich dabei um die Kernmembran(en) handelt. Außerdem sind rechts oben einzelne Proteinaggregate zu erkennen. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



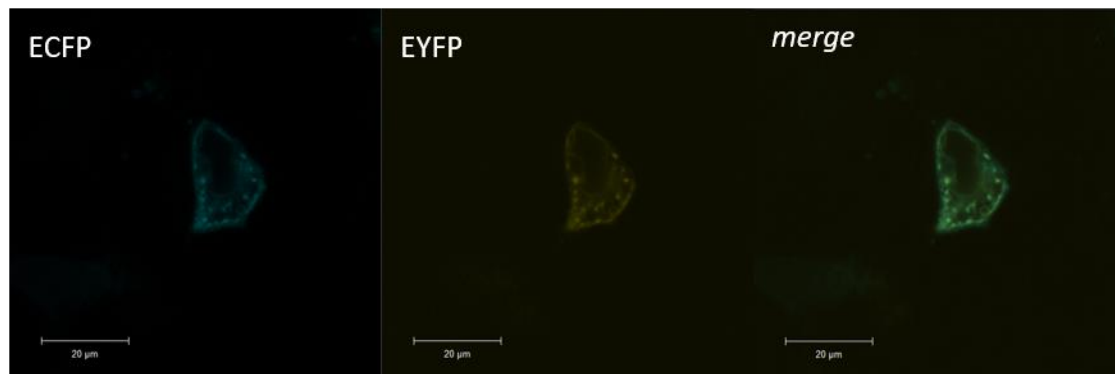
**Abbildung 20: Lokalisation des *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein ist in der Zellmembran lokalisiert, befindet sich daneben aber auch im Zytoplasma. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



**Abbildung 21: Lokalisation des *S4-EYFP-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein erscheint sowohl in intrazellulären Membranen und im Zytoplasma, weniger auch in der Zellmembran. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



**Abbildung 22: Lokalisation des *S5-EYFP-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein erscheint sowohl in intrazellulären Membranen und im Zytoplasma, weniger auch in der Zellmembran. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



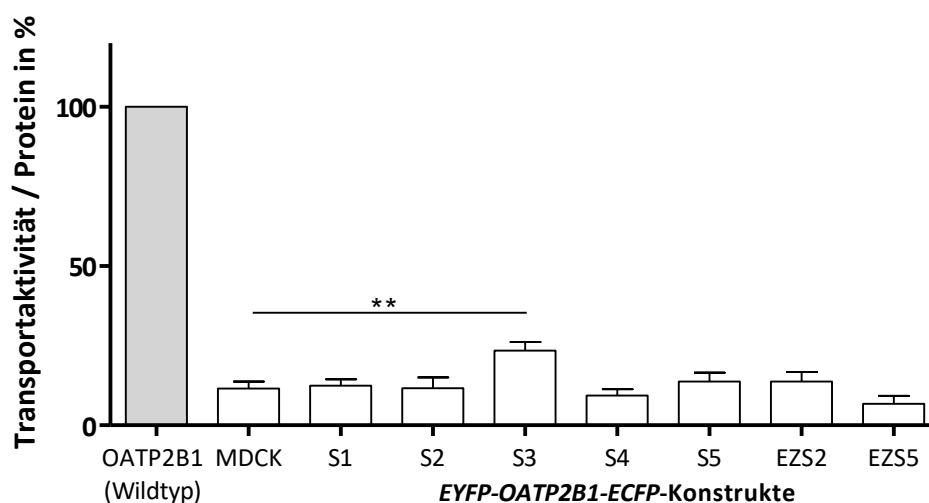
**Abbildung 23: Lokalisation des *EZS2-EYFP-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein erscheint gleichermaßen im Zytoplasma als auch in der Zellmembran. Intrazellulär sind außerdem Proteinaggregate oder vesikuläre Strukturen zu erkennen. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).

Generell zeigte sich jedes Konstrukt zumindest teilweise in der Zellmembran lokalisiert. Allerdings war in fast allen Fällen auch eine mehr oder weniger starke intrazelluläre Lokalisation zu erkennen.



### 3.3.2 Funktion

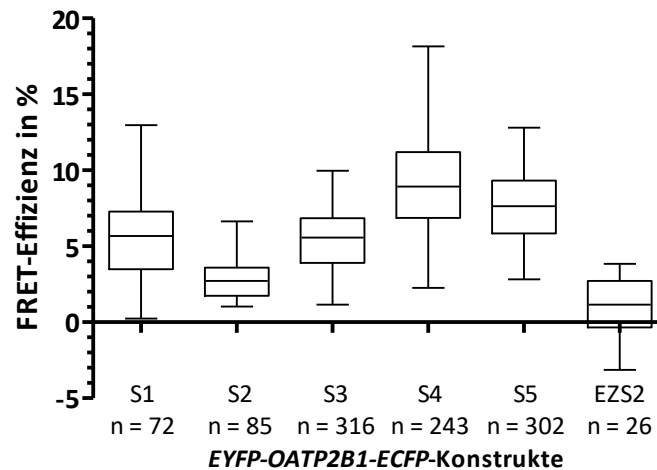
Als Parameter zur Feststellung der Funktion wurde die Transportaktivität der Konstrukte für das Tritium-markierte OATP2B1-Standardsubstrat  $E_1S$  erhoben. Der Versuch wurde 48 h nach der transienten Transfektion in MDCKII-Zellen durchgeführt. Als Kontrollen dienten das Wildtyp-OATP2B1 (als 100 %) sowie untransfizierte MDCKII-Zellen ( $11,51 \% \pm 2,21$  [Mittelwert  $\pm$  SD]). Ein signifikanter Transport im Vergleich zu den MDCKII-Zellen konnte dabei lediglich beim Konstrukt *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* ( $23,41 \% \pm 2,73$ ) festgestellt werden. Der Wert lag dabei allerdings weit unter dem des Wildtyp-OATP2B1. Die Transportaktivität aller anderen Konstrukte lag auf Höhe der MDCKII-Zellen (max.  $13,79 \% \pm 2,99$  für *EZS2 EYFP-OATP2B1-ECFP*).



**Diagramm 7: Darstellung der Transportaktivität der *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine.** Gezeigt ist die Aufnahme von Tritium-markiertem Estron-3-sulfat ( $E_1S$ , 5 nM) in transient transfizierten MDCKII-Zellen über eine Dauer von 5 min. Die Aktivität ist auf den Gesamtproteingehalt bezogen und prozentual zum Wildtyp-OATP2B1 dargestellt. Säulendiagramm mit Mittelwerten  $\pm$  SD,  $n = 2 - 4$ . Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau:  $p < 0,01$  (\*\*).

### 3.3.3 FRET-Effizienz

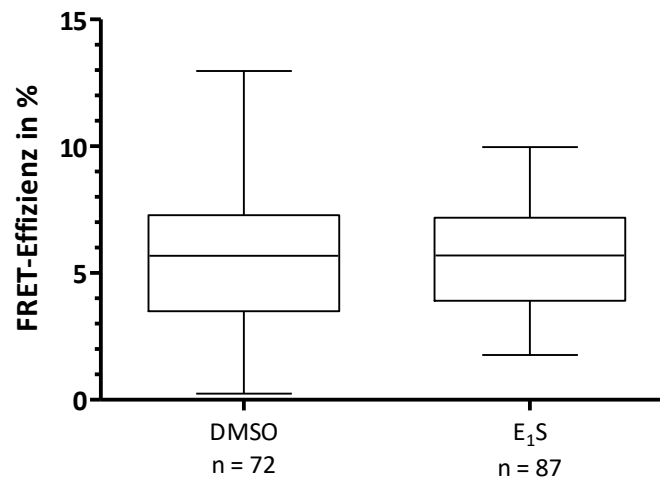
Trotz der fehlenden Transportaktivität der meisten Konstrukte wurde für alle anschließend die FRET-Effizienz bestimmt. Dadurch sollte zunächst festgestellt werden, ob die Konstrukte überhaupt ein Signal zeigen. Es diente außerdem dazu, Unterschiede aufgrund der Position des integrierten EYFP zu ermitteln. Wie Diagramm 8 zeigt, konnte für alle Konstrukte eine FRET-Effizienz bestimmt werden, die signifikant über dem Hintergrund lag. Dabei wurde für das Konstrukt *S4-EYFP-OATP2B1-ECFP* die höchste Effizienz ( $9,02 \% \pm 3,16$  [Mittelwert  $\pm$  SD]) und für *ESZ2-EYFP-OATP2B1-ECFP* die geringste ( $1,15 \% \pm 1,89$ ) ermittelt. Eine etwa gleiche FRET-Effizienz wiesen die Konstrukte *S1-EYFP-OATP2B1-ECFP* ( $5,66 \% \pm 2,83$ ) und *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* ( $5,43 \% \pm 2,02$ ) auf. Etwas darunter lag *S2-EYFP-OATP2B1-ECFP* ( $2,93 \% \pm 1,41$ ) und darüber *S5-EYFP-OATP2B1-ECFP* ( $7,7 \% \pm 2,43$ ).



**Diagramm 8: FRET-Effizienzen der *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine nach Position.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum.

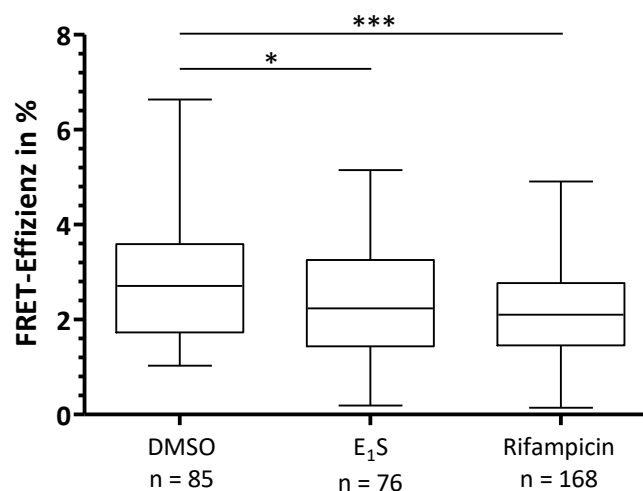
Im weiteren Verlauf wurden die einzelnen Konstrukte mit dem EYFP in den intrazellulären Schleifen noch jeweils in Anwesenheit des Substrats  $E_1S$  (10  $\mu M$ ) vermessen. Dies sollte die zentrale Frage nach der Beeinflussung der FRET-Effizienz aufgrund von Substratbindung und/oder -transport beantworten. Konstrukte bei denen eine Beeinflussung festgestellt werden konnte, wurden darüber hinaus auch noch in Anwesenheit des Inhibitors Rifampicin (10  $\mu M$ ) vermessen. Als einziges transportaktives Konstrukt wurde *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* auch noch mit dem Nicht-OATP2B1-Substrat 17 $\beta$ -Estradiol-3-glucuronid (E17 $\beta$ G; 10  $\mu M$ ) vermessen.

Von allen Konstrukten war *S1-EYFP-OATP2B1-ECFP* das einzige, dessen FRET-Effizienz nicht durch  $E_1S$  beeinflusst wurde (vgl. Diagramm 9). Der Wert für  $E_1S$  ( $5,66 \% \pm 2,83$ ) war dabei dem des DMSO ( $5,75 \% \pm 2,05$ ) fast identisch.



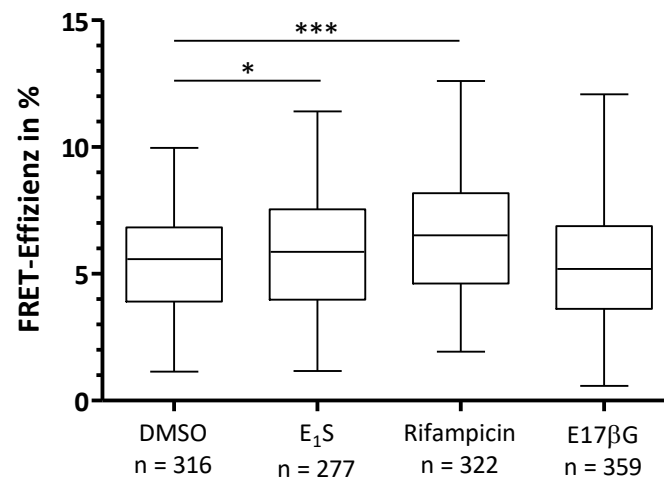
**Diagramm 9: FRET-Effizienz *S1-EYFP-OATP2B1-ECFP* unter Substanzgabe.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %) bzw.  $E_1S$  (10  $\mu M$ ). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), kein signifikanter Unterschied feststellbar ( $p < 0,05$ ).

Für *S2-EYFP-OATP2B1-ECFP* war eine Modifizierung der FRET-Effizienz durch Zugabe von  $E_1S$  möglich (vgl. Diagramm 10). Hier zeigte sich ein signifikanter Abfall ( $2,41 \% \pm 1,2$ ) im Vergleich zum DMSO ( $2,93 \% \pm 1,41$ ). Noch weiter vermindert war die Effizienz in Gegenwart von Rifampicin ( $2,21 \% \pm 1,1$ ).



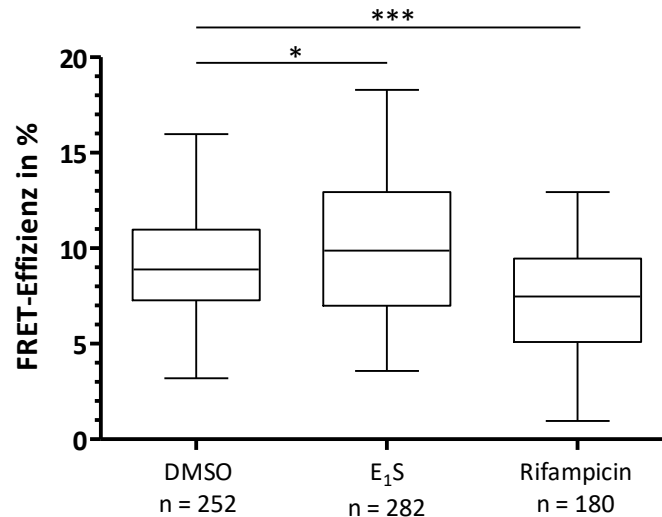
**Diagramm 10: FRET-Effizienz *S2-EYFP-OATP2B1-ECFP* unter Substanzgabe.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %),  $E_1S$  (10  $\mu M$ ) oder Rifampicin (10  $\mu M$ ). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*).

Auch die FRET-Effizienz vom *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* ließ sich durch Zugabe von Substanzen modifizieren (vgl. Diagramm 11). Im Gegensatz zum vorherigen Konstrukt war hier ein Anstieg der Effizienz in Anwesenheit von  $E_1S$  ( $5,85 \% \pm 2,33$ ) gegenüber DMSO ( $5,43 \% \pm 2,02$ ) zu beobachten. Weiterhin ließ sich der Anstieg in Gegenwart von Rifampicin ( $6,63 \% \pm 2,58$ ) noch steigern. Keinen signifikanten Effekt zeigte dagegen die Anwesenheit von  $E17\beta G$  ( $5,23 \% \pm 2,13$ ).



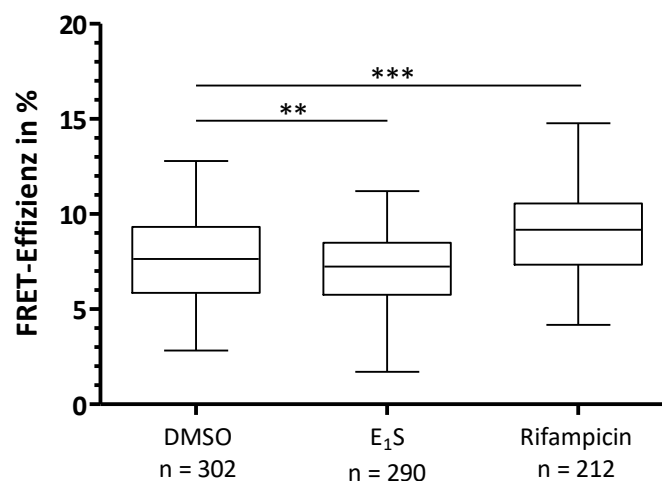
**Diagramm 11: FRET-Effizienz *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* unter Substanzgabe.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %),  $E_1S$  (10  $\mu M$ ), Rifampicin (10  $\mu M$ ) oder  $E17\beta G$  (10  $\mu M$ ). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*).

Die FRET-Effizienz von *S4-EYFP-OATP2B1-ECFP* wurde ebenfalls durch Substanzen beeinflusst (vgl. Diagramm 12). Dabei führte die Anwesenheit von  $E_1S$  ( $10,15 \% \pm 3,749$ ) zu einer Erhöhung im Vergleich zu DMSO ( $9,02 \% \pm 2,89$ ), die von Rifampicin ( $7,23 \% \pm 2,99$ ) jedoch zu einer Erniedrigung der FRET-Effizienz, anders als es bei den bisherigen Konstrukten der Fall war.



**Diagramm 12: FRET-Effizienz S4-EYFP-OATP2B1-ECFP unter Substanzgabe.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %), E<sub>1</sub>S (10  $\mu$ M) oder Rifampicin (10  $\mu$ M). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*).

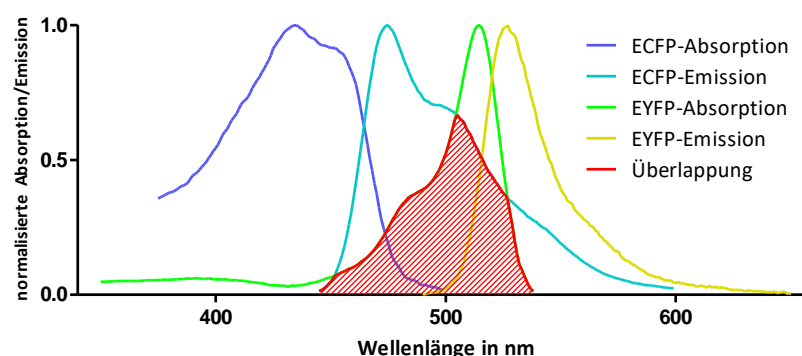
Anders als beim vorherigen Konstrukt war die Beeinflussung der FRET-Effizienz von S5-EYFP-OATP2B1-ECFP zu beobachten (vgl. Diagramm 13). Hier konnte ein Abfall bei E<sub>1</sub>S ( $7,16 \% \pm 2,02$ ) und ein Anstieg unter Rifampicingabe ( $8,98 \% \pm 2,39$ ) im Vergleich zu DMSO ( $7,7 \% \pm 2,43$ ) verzeichnet werden.



**Diagramm 13: FRET-Effizienz S5-EYFP-OATP2B1-ECFP unter Substanzgabe.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %), E<sub>1</sub>S (10  $\mu$ M) oder Rifampicin (10  $\mu$ M). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und EYFP-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveaus:  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*).

### 3.3.4 *In silico*-Analyse

Da bisher keine FRET-Analysen für das OATP2B1 zur Verfügung stehen, sollte die Generierung von 3D-Strukturmodellen und deren Auswertung hinsichtlich der intramolekularen Distanzen als Interpretationsansatz der erhobenen FRET-Daten dienen. Zur Berechnung der Modelle wurden die Aminosäuresequenzen der Konstrukte ohne das ECFP genutzt. Der Grund hierfür lag in der Limitation des verwendeten Programms, strukturähnliche Proteine, wie ECFP und EYFP, in einem Modell zusammen darzustellen. Statt den Abstand zwischen ECFP und EYFP zu nutzen, wurde daher alternativ der Abstand zwischen EYFP und dem C-Terminus des OATP2B1 gewählt. Der Abstand wurde dabei immer zwischen dem C-3 des Valins an letzter Position des OATP2B1 sowie dem C-4 des Leucin-68 aus dem EYFP bestimmt. Die Berechnung der Abstände anhand der gemessenen FRET-Effizienzen erfolgte nach Formel 1 (vgl. 1.3.1). Grundlage dafür war die Ermittlung des für das FRET-Paar geltenden Förster-Radius ( $R_0$ ) nach Formel 2. Dabei liegt die Quantenausbeute ( $Q_D$ ) des Donors, hier ECFP, bei 0,4 (Markwardt et al. 2011). Der Brechungsindex des verwendeten Mediums ( $n$ ) wurde durch die Mittelwertberechnung aus dem Index des IP zzgl. DMSO (gemessen 1,33;  $n = 3$ ) und dem Index von Proteinen (1,6 [Lindenburg und Merckx 2014]) berechnet und fließt mit 1,465 ein. Der Orientierungsfaktor ( $\kappa^2$ ) wird als  $\frac{2}{3}$  angenommen (Medintz und Hildebrandt 2013). Mit den Spektren von ECFP und EYFP und Formel 3 wurde zuletzt das Integral des überlappenden Bereichs des Emissionsspektrums vom ECFP mit dem des Absorptionsspektrums vom EYFP ( $J(\lambda)$ , vgl. Diagramm 14) berechnet und ergab  $2,29697 \cdot 10^{15} \frac{\text{nm}^4}{(\text{M} \cdot \text{cm})}$ . Für das FRET-Paar ECFP/EYFP wurde damit  $R_0$  gleich 4,764 nm berechnet.

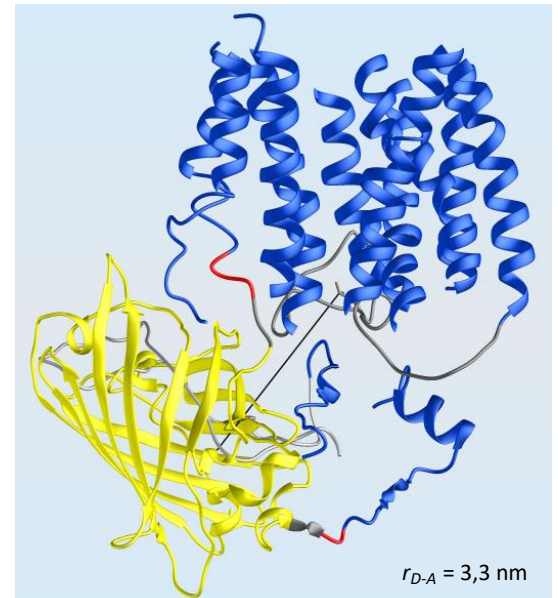
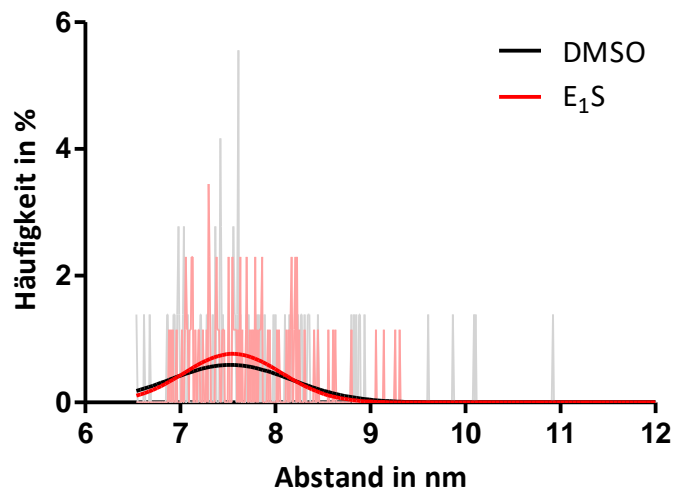


**Diagramm 14: Spektren von ECFP und EYFP mit Überlappungsbereich für  $J(\lambda)$ .** Gezeigt sind die Spektren der Absorption sowie Emission von ECFP und EYFP. Der rot schraffierte Bereich markiert die Überlappung des ECFP-Emissionsspektrums mit dem EYFP-Absorptionsspektrum.

Mithilfe von  $R_0$  und Formel 1 konnte nun für jeden einzelnen Messwert der FRET-Effizienz der zugehörige Abstand  $r_{D-A}$  berechnet werden. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Abstände

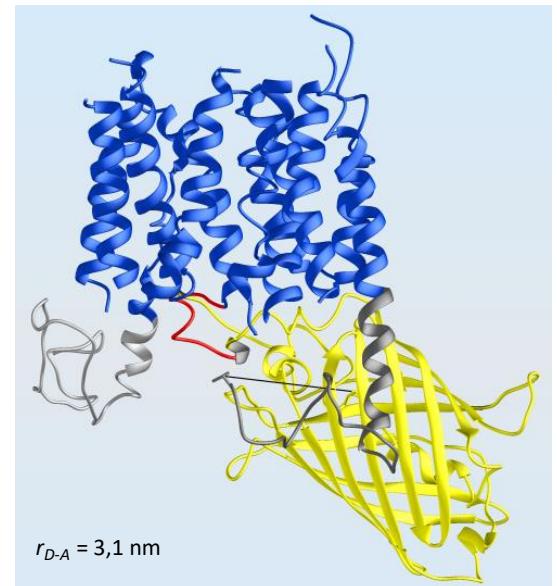
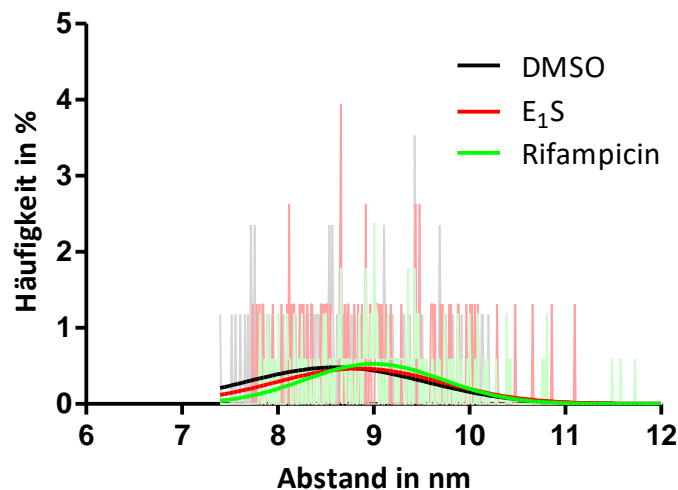
wurde nachfolgend für jedes Konstrukt zusammen mit den Gauß-Verteilungskurven in einem Diagramm dargestellt. Dazu abgebildet ist jeweils das 3D-Modell mit dem ausgemessenen Abstand zwischen C-Terminus und EYFP.

Für das Konstrukt *S1-EYFP-OATP2B1-ECFP* lag der Mittelwert der Gauß-Verteilung bei 7,53 nm für DMSO und 7,55 nm für E<sub>1</sub>S. Der dazu ausgemessene Abstand im 3D-Modell lag hingegen bei nur 3,3 nm (vgl. Diagramm 15).



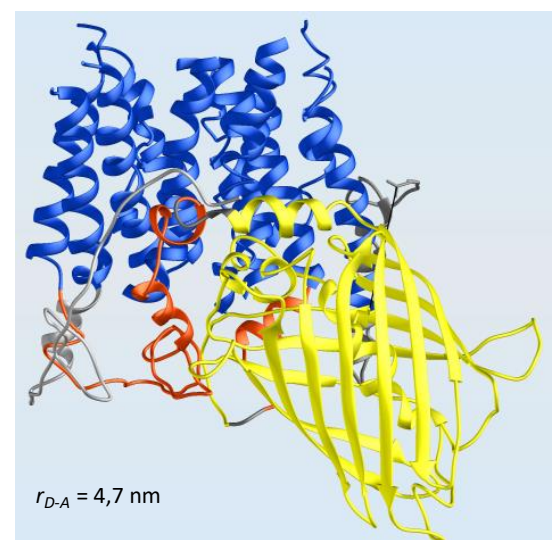
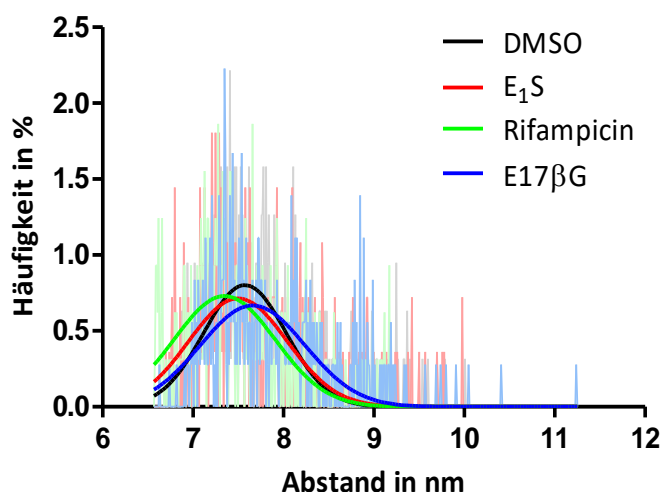
**Diagramm 15: Abstandsberechnung *S1-EYFP-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembranomänen (blau), der ersten intrazellulären Schleife (rot) sowie dem EYFP (gelb). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus dunkelgrau eingefärbt. Der Übergang der Schleife zum EYFP ist ebenfalls grau (Restriktionsmutation). Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

Für *S2-EYFP-OATP2B1-ECFP* wurden Mittelwerte von 8,6 nm für DMSO, 8,85 nm für  $E_1S$  und 9,0 nm für Rifampicin bestimmt. Der ausgemessene Abstand lag bei nur 3,1 nm (vgl. Diagramm 16).



**Diagramm 16: Abstandsberechnung *S2-EYFP-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembranomänen (blau), der zweiten intrazellulären Schleife (rot) sowie dem EYFP (gelb). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus dunkelgrau eingefärbt. Der Übergang der Schleife zum EYFP ist ebenfalls grau (Restriktionsmutation). Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

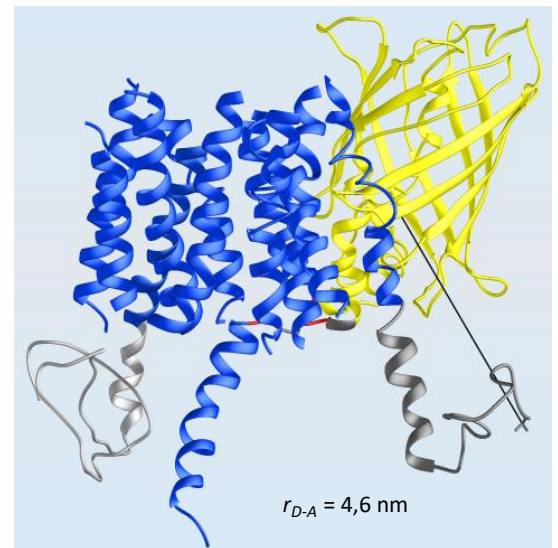
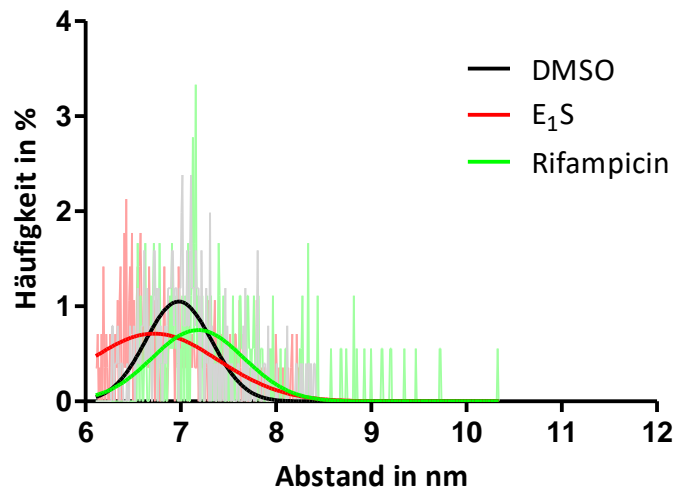
Die Berechnung der Abstände bei *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* ergab Mittelwerte von 7,57 nm für DMSO, 7,5 nm für  $E_1S$ , 7,35 nm für Rifampicin sowie 7,66 nm für  $E17\beta G$ . Im 3D-Modell wurde ein Abstand von 4,7 nm ausgemessen (vgl. Diagramm 17).



**Diagramm 17: Abstandsberechnung *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembranomänen (blau), der dritten intrazellulären Schleife (rot) sowie dem EYFP (gelb). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus dunkelgrau eingefärbt. Der Übergang der Schleife zum EYFP ist ebenfalls grau (Restriktionsmutation). Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

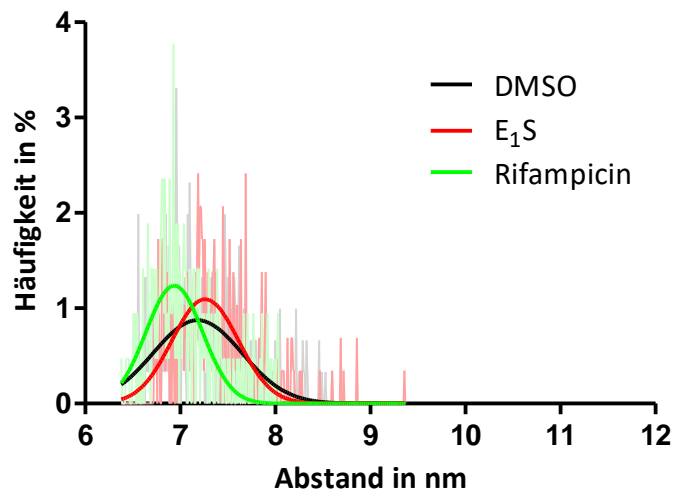


Bei *S4-EYFP-OATP2B1-ECFP* wurden Mittelwerte von 6,98 nm für DMSO, 6,72 nm für E1S und 7,18 nm für Rifampicin errechnet. Der im Modell ausgemessene Abstand lag bei 4,6 nm (vgl. Diagramm 18).



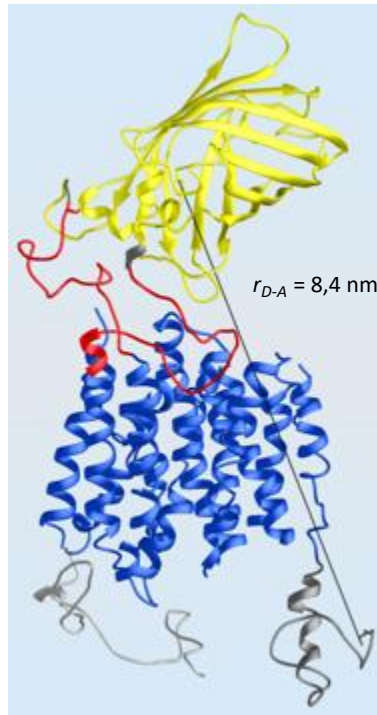
**Diagramm 18: Abstandsberechnung *S4-EYFP-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembrandomänen (blau), der vierten intrazellulären Schleife (rot) sowie dem EYFP (gelb). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus dunkelgrau eingefärbt. Der Übergang der Schleife zum EYFP ist ebenfalls grau (Restriktionsmutation). Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

Für *S5-EYFP-OATP2B1-ECFP* lagen die Mittelwerte bei 7,18 nm für DMSO, 7,26 nm für E1S und 6,94 nm für Rifampicin. Der Abstand im 3D-Modell lag bei 7,0 nm (vgl. Diagramm 19).



**Diagramm 19: Abstandsberechnung *S5-EYFP-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembrandomänen (blau), der fünften intrazellulären Schleife (rot) sowie dem EYFP (gelb). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus dunkelgrau eingefärbt. Der Übergang der Schleife zum EYFP ist ebenfalls grau (Restriktionsmutation). Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

Aufgrund der anteilig großen Anzahl von negativen FRET-Effizienzen war eine korrekte Berechnung für *ESZ2-EYFP-OATP2B1-ECFP* nicht möglich. Daher wird auf eine Darstellung der Häufigkeitsverteilung verzichtet. Alternativ wurde in Annäherung der Mittelwert der errechenbaren Distanzen (der positiven FRET-Effizienzen) gewählt. Dieser ergab 9,9 nm, wohingegen die Distanz im Modell bei 8,4 nm lag (vgl. Abbildung 3).



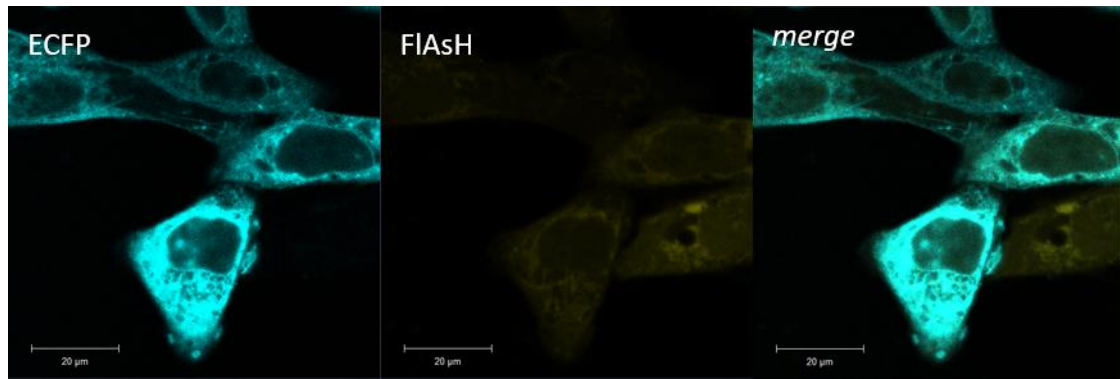
**Abbildung 24: 3D-Modell von EZS2-EYFP-OATP2B1-ECFP.** Modell mit den Transmembrandomänen (blau), der zweiten extrazellulären Schleife (rot) sowie dem EYFP (gelb). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus dunkelgrau eingefärbt. Der Übergang der Schleife zum EYFP ist ebenfalls grau (Restriktionsmutation). Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

### 3.4 Charakterisierung der *FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine

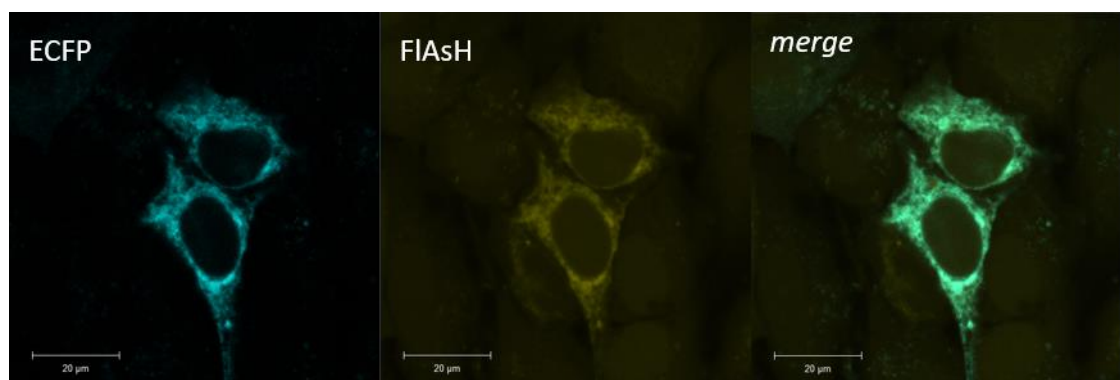
Bei der Charakterisierung der *FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine wurde analog zu den *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteinen verfahren. Auch hier wurde die Lokalisation und die Transportaktivität überprüft sowie die FRET-Effizienz gemessen und eine *in silico*-Analyse durchgeführt.

#### 3.4.1 Lokalisation

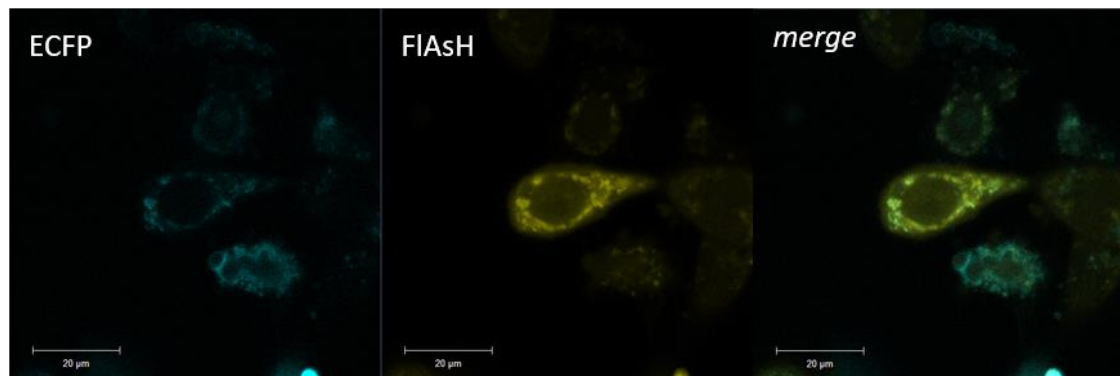
Während der Überprüfung der Lokalisation konnte zunächst festgestellt werden, dass alle Konstrukte exprimiert werden. Im Folgenden werden zunächst die Aufnahmen der Konstrukte *S2-* bis *S5-FIAsH-OATP2B1-ECFP* gezeigt, im Anschluss die der Konstrukte *EZS2-* und *EZS5-FIAsH-OATP2B1-ECFP*. Die Beschreibung der Lokalisation befindet sich jeweils in der Bildunterschrift.



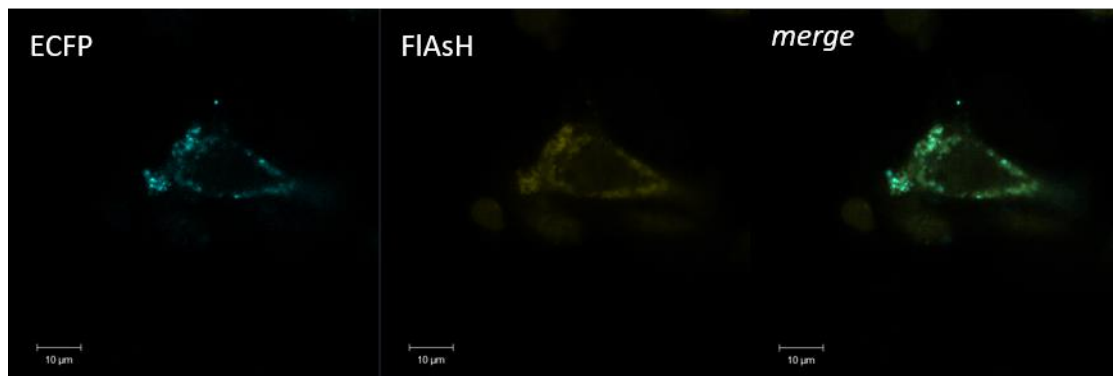
**Abbildung 25: Lokalisation des *S2-FlAsH-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein ist hauptsächlich intrazellulär zu finden. Eine eindeutige Sortierung in die Zellmembran oder spezifische intrazelluläre Strukturen ist nicht auszumachen. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FlAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



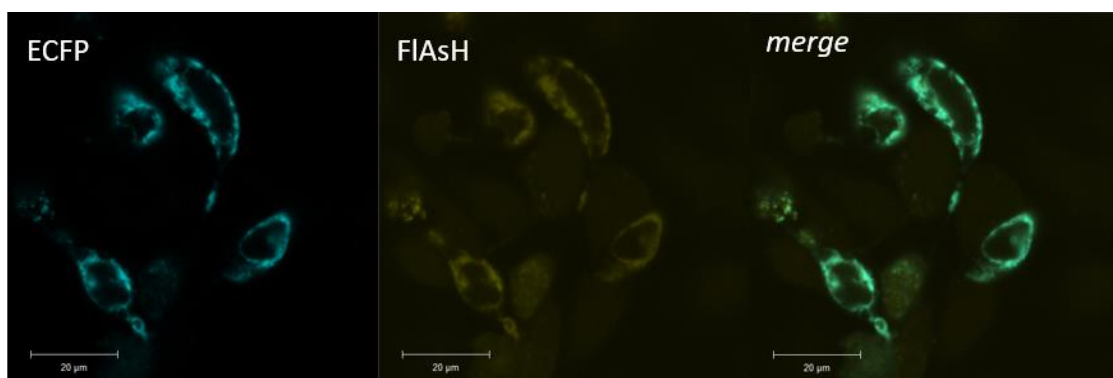
**Abbildung 26: Lokalisation des *S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein ist hauptsächlich intrazellulär zu finden. Eine eindeutige Sortierung in die Zellmembran oder spezifische intrazelluläre Strukturen ist nicht auszumachen. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FlAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



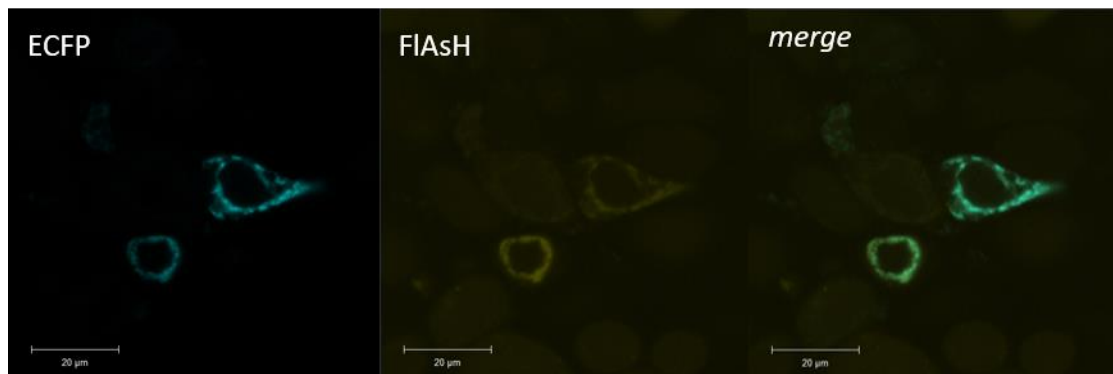
**Abbildung 27: Lokalisation des *S4-FlAsH-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein ist hauptsächlich intrazellulär zu finden. Es tritt dabei teilweise konzentriert in nicht näher identifizierbaren Strukturen auf. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FlAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



**Abbildung 28: Lokalisation des *S5-FIAsH-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein ist hauptsächlich intrazellulär zu finden. Es bildet dabei teilweise Proteinaggregate oder vesikuläre Strukturen und ist ansonsten diffus verteilt. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).



**Abbildung 29: Lokalisation des *EZS2-FIAsH-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein ist primär im Intrazellularraum zu finden. Eine teilweise Sortierung in die Zellmembran kann nicht komplett ausgeschlossen werden. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).

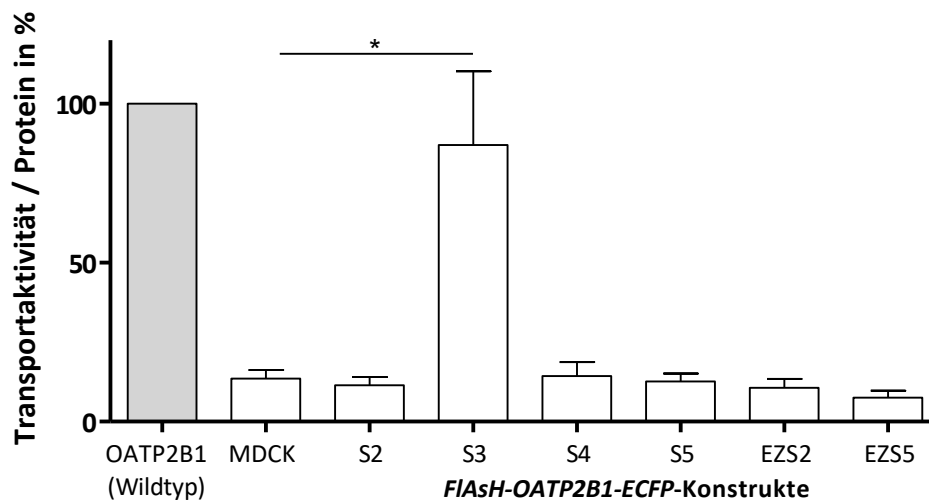


**Abbildung 30: Lokalisation des *EZS5-FIAsH-OATP2B1-ECFP* in MDCKII-Zellen.** Das Protein ist primär im Intrazellularraum zu finden. Eine teilweise Sortierung in die Zellmembran kann nicht komplett ausgeschlossen werden. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm).

### 3.4.2 Funktion

Auch für die *FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine wurde zur Feststellung der Funktion die Transportaktivität für das Tritium-markierte OATP2B1-Standardsubstrat  $E_1S$  erhoben. Der Versuch wurde 48 h nach der transienten Transfektion in MDCKII-Zellen durchgeführt. Als Kon-

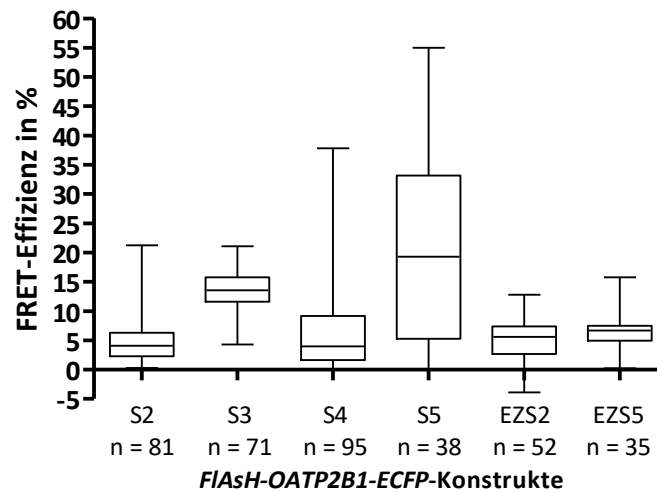
trollen dienten das Wildtyp-OATP2B1 (als 100 %) sowie MDCKII-Zellen (13,54 %  $\pm$  2,68 [Mittelwert  $\pm$  SD]). Ein signifikanter Transport im Vergleich zu den MDCKII-Zellen konnte dabei lediglich beim Konstrukt *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP* (87,00 %  $\pm$  23,27) festgestellt werden, dessen Transportaktivität vergleichbar mit dem Wildtyp-OATP2B1 war. Die Transportaktivität aller anderen Konstrukte lag auf Höhe der MDCKII-Zellen (max. 14,32 %  $\pm$  4,43 für *S4-FIAsh-OATP2B1-ECFP*).



**Diagramm 20: Transportaktivität der *FIAsh-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine.** Gezeigt ist die Aufnahme von Tritium-markiertem Estron-3-sulfat (5 nM) in transient transfizierten MDCKII-Zellen über eine Dauer von 5 min. Die bestimmte Aktivität ist auf den Gesamtproteingehalt bezogen und prozentual dargestellt, wobei das Wildtyp-OATP2B1 als 100 % normiert ist. Säulendiagramm mit Mittelwerten + SD, n = 2 – 4. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau: p < 0,05 (\*).

### 3.4.3 FRET-Effizienz

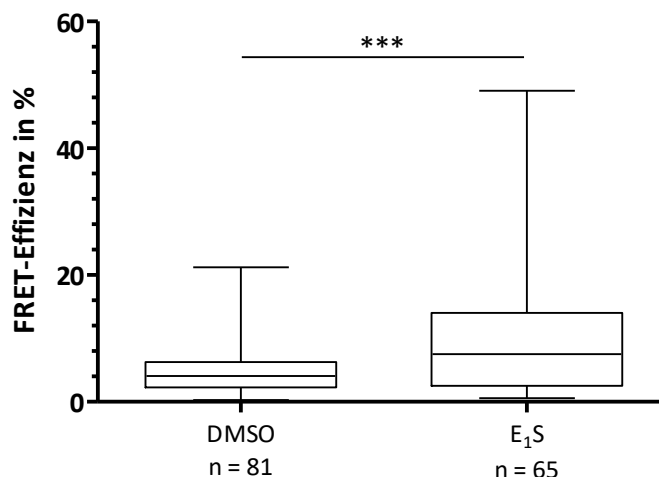
Auch hier wurde für alle Konstrukte die FRET-Effizienz bestimmt. Dadurch sollte zunächst festgestellt werden, ob die Konstrukte überhaupt ein Signal zeigen. Es diente außerdem dazu, Unterschiede aufgrund der Position des integrierten FIAsh zu ermitteln. Wie gezeigt, konnte für alle Konstrukte eine FRET-Effizienz bestimmt werden. Dabei wurde für das Konstrukt *S5-FIAsh-OATP2B1-ECFP* die höchste Effizienz (20,12 %  $\pm$  15,83 [Mittelwert  $\pm$  SD]) und für *S2-FIAsh-OATP2B1-ECFP* die geringste (4,97 %  $\pm$  4,13) ermittelt. Eine etwa gleiche FRET-Effizienz wiesen die Konstrukte *S4-FIAsh-OATP2B1-ECFP* (6,49 %  $\pm$  7,53) und *EZS5-FIAsh-OATP2B1-ECFP* (6,39 %  $\pm$  2,96) auf. Darunter lag *EZS2-FIAsh-OATP2B1-ECFP* (5,12 %  $\pm$  3,45) und darüber *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP* (13,61 %  $\pm$  3,6).



**Diagramm 21: FRET-Effizienzen der FIAsh-OATP2B1-ECFP-Fusionsproteine nach Position.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsh-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum.

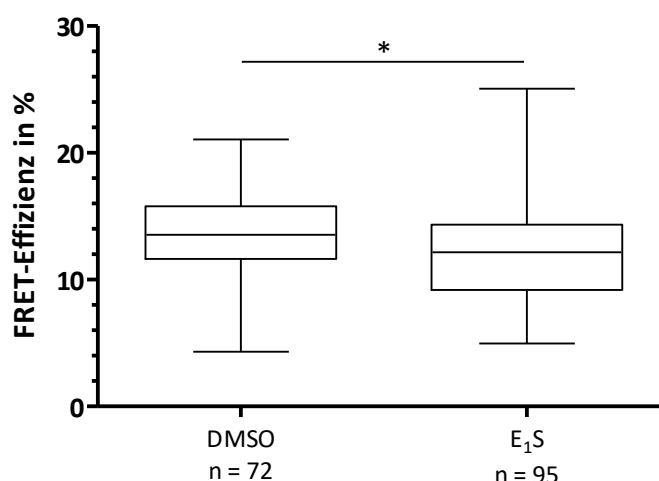
Die Konstrukte mit FIAsh in den intrazellulären Schleifen wurden zudem in Anwesenheit des OATP2B1-Substrats E<sub>1</sub>S (10 µM) vermessen. Im Gegensatz zu den EYFP-Konstrukten konnte bei allen FIAsh-Konstrukten eine Beeinflussung durch E<sub>1</sub>S festgestellt werden. Da sich das Konstrukt *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP* wegen seiner Transportaktivität bereits als vielversprechendste Variante gezeigt hatte, wurde auf eine Vermessung der transient transfizierten Zellen mit anderen Substanzen verzichtet. *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP* wurde für weitere Untersuchungen stabil transfiziert und gesondert charakterisiert (ab Kapitel 3.5).

Das Konstrukt *S2-FIAsH-OATP2B1-ECFP* zeigte eine veränderte FRET-Effizienz durch Substanzgabe (vgl. Diagramm 22). Im Mittel lag die FRET-Effizienz in Gegenwart von  $E_1S$  ( $10,69 \% \pm 10,53$ ) etwa doppelt so hoch wie bei DMSO ( $4,97 \% \pm 4,13$ ).



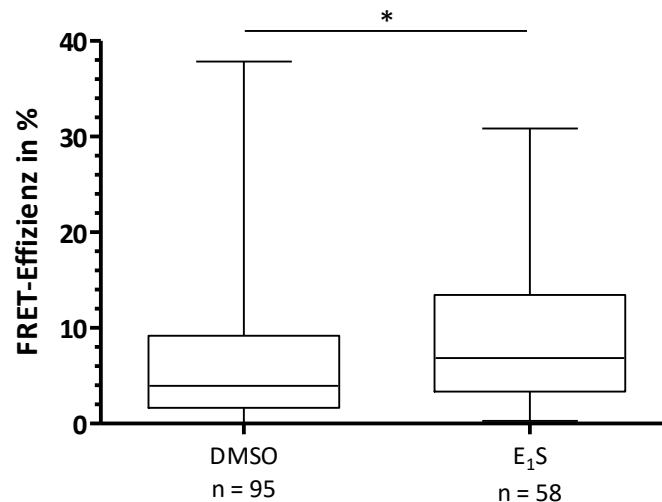
**Diagramm 22: FRET-Effizienz *S2-FIAsH-OATP2B1-ECFP* unter Substanzgabe.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %) bzw.  $E_1S$  (10  $\mu M$ ). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau:  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Auch die Effizienz von *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* änderte sich unter Substanzgabe (vgl. Diagramm 23). Hier war ein Abfall unter  $E_1S$  ( $12,26 \% \pm 3,71$ ) im Vergleich zu DMSO ( $13,61 \% \pm 3,6$ ) zu verzeichnen.



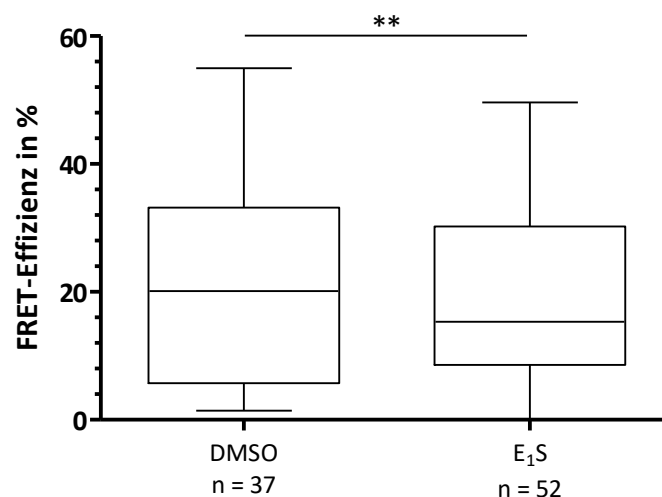
**Diagramm 23: FRET-Effizienz *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* unter Substanzgabe.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %) bzw.  $E_1S$  (10  $\mu M$ ). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau:  $p < 0,05$  (\*)

*S4-FIAsH-OATP2B1-ECFP* zeigte ebenfalls eine Veränderung seiner FRET-Effizienz (vgl. Diagramm 24). Wie schon beim ersten Konstrukt führte  $E_1S$  ( $9,57 \% \pm 7,93$ ) hier zu einem Anstieg der FRET-Effizienz im Vergleich zu DMSO ( $6,49 \% \pm 7,53$ ).



**Diagramm 24: FRET-Effizienz *S4-FIAsH-OATP2B1-ECFP* unter Substanzgabe.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %) bzw.  $E_1S$  (10  $\mu M$ ). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau:  $p < 0,05$  (\*).

Die FRET-Effizienz des letzten intrazellulär markierten Konstruktes *S5-FIAsH-OATP2B1-ECFP* war ebenfalls zu beeinflussen (vgl. Diagramm 25). Unter  $E_1S$  ( $19,61 \% \pm 13,55$ ) kam es zu einer Verringerung der FRET-Effizienz im Vergleich zu DMSO ( $20,66 \% \pm 15,68$ ).

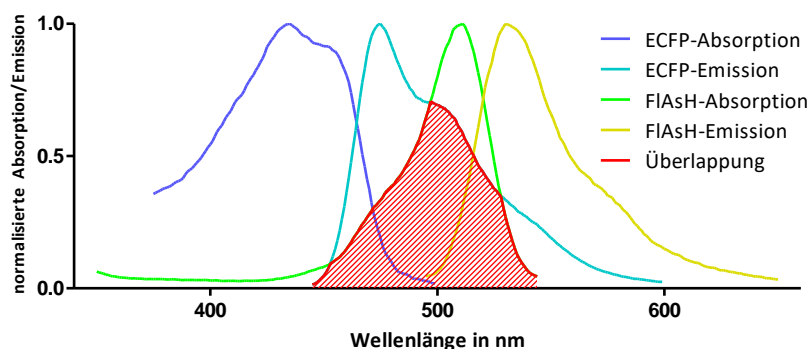


**Diagramm 25: FRET-Effizienz *S5-FIAsH-OATP2B1-ECFP* unter Substanzgabe.** Gemessen mittels *photobleaching* mit IP zzgl. DMSO (0,1 %) bzw.  $E_1S$  (10  $\mu M$ ). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der transienten Transfektion mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau:  $p < 0,01$  (\*\*).



### 3.4.4 *In silico*-Analyse

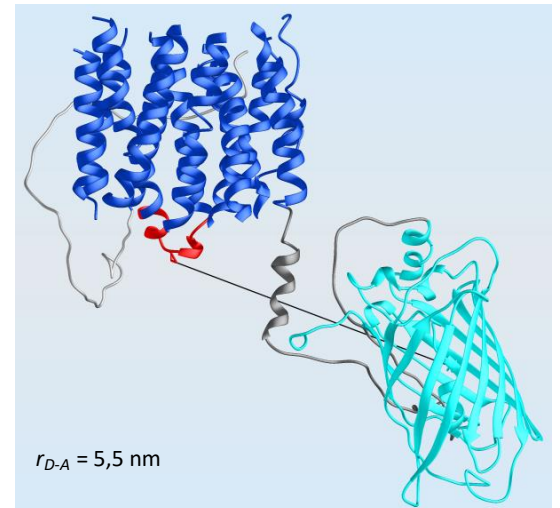
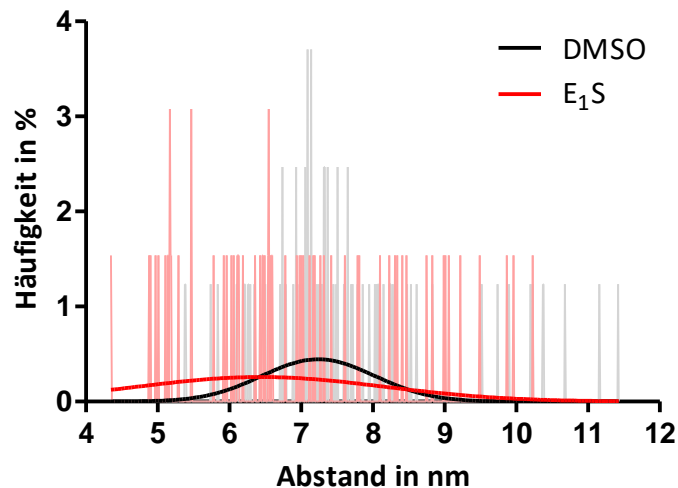
Bei der *in silico*-Analyse der *FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine wurde ebenso verfahren wie bei den *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteinen (3.3.4). Der Unterschied bei der Ausmessung der 3D-Modelle war, dass die Distanz hier vom C-4 des Prolins des eingeführten Tetracystein-Motivs (CCPGCC) zum C-4 des Leucin-64 im ECFP gemessen wurde. Für die Berechnung von  $R_0$  für das FRET-Paar ECFP/FIAsH nach Formel 2 war lediglich das Überlappungsintegral ( $J(\lambda)$ , vgl. Diagramm 26) anzupassen. Dieses ergab für die beiden Spektren von ECFP und FIAsH  $1,28249 \cdot 10^{15} \frac{\text{nm}^4}{(\text{M} \cdot \text{cm})}$ . Der damit für das FRET-Paar berechnete Förster-Radius betrug 4,323 nm.



**Diagramm 26: Spektren von ECFP und FIAsH mit Überlappungsbereich für  $J(\lambda)$ .** Gezeigt sind die Spektren der Absorption sowie Emission von ECFP und FIAsH. Der rot schraffierte Bereich markiert die Überlappung des ECFP-Emissionsspektrums mit dem FIAsH-Absorptionsspektrum.

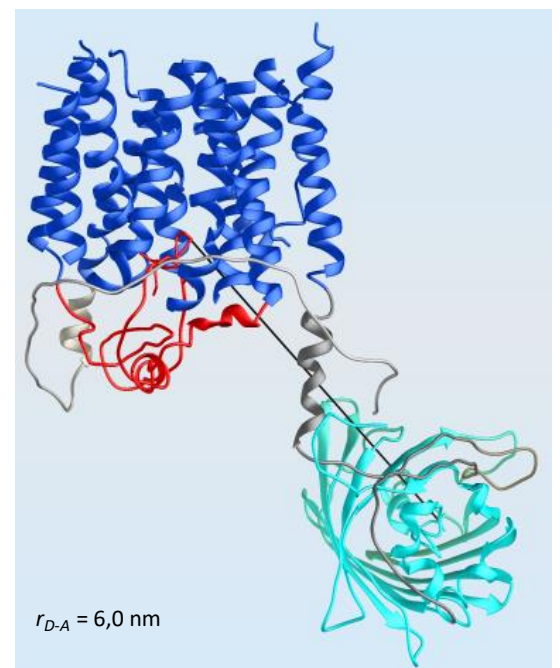
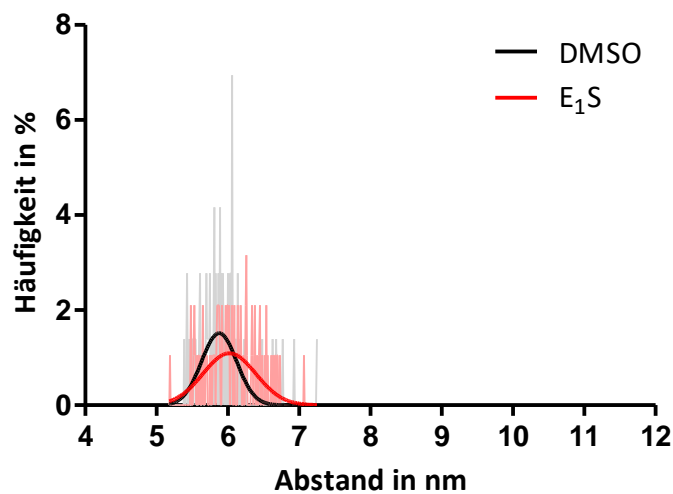
Wie zuvor konnte nun mithilfe von  $R_0$  und Formel 1 für jeden einzelnen Messwert der FRET-Effizienz der zugehörige Abstand  $r_{D-A}$  berechnet werden. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Abstände ist nachfolgend für jedes Konstrukt zusammen mit den Gauß-Verteilungskurven in einem Diagramm dargestellt. Dazu abgebildet ist jeweils das 3D-Modell mit dem ausgemessenen Abstand zwischen TC-Motiv und der chromophoren Gruppe des ECFP.

Die damit erhobenen Mittelwerte der Gauß-Verteilung lagen für *S2-FIAsH-OATP2B1-ECFP* bei 7,24 nm für DMSO und 6,44 nm für  $E_1S$ . Im 3D-Modell ausgemessen wurde ein etwas geringerer Abstand von 5,5 nm (vgl. Diagramm 27).



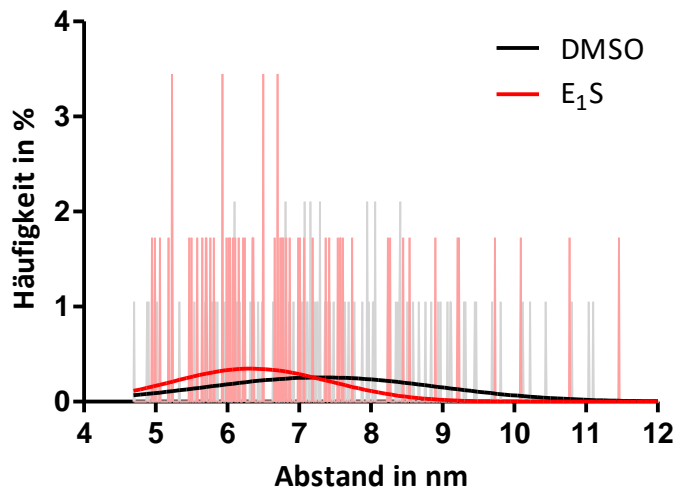
**Diagramm 27: Abstandsberechnung S2-FIAsH-OATP2B1-ECFP sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembrandomänen (blau), der zweiten intrazellulären Schleife mit dem TC-Motiv (rot) sowie dem C-terminal gebundenen ECFP (cyan). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus mit dem Übergang zum ECFP ist dunkelgrau. Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

Die Berechnung für S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP ergab Werte von 5,88 nm für DMSO und 6,02 nm für E<sub>1</sub>S. Fast identisch war auch der ausgemessene Wert mit 6,0 nm (vgl. Diagramm 28).

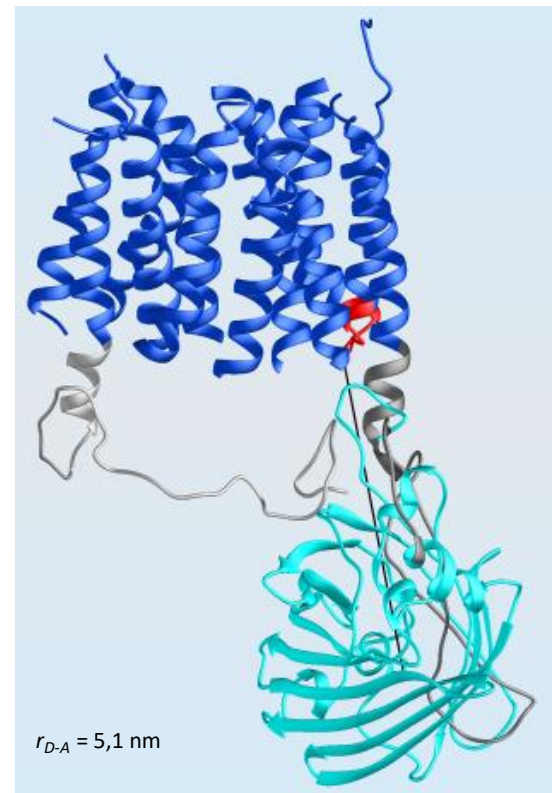


**Diagramm 28: Abstandsberechnung S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembrandomänen (blau), der dritten intrazellulären Schleife mit dem TC-Motiv (rot) sowie dem C-terminal gebundenen ECFP (cyan). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus mit dem Übergang zum ECFP ist dunkelgrau. Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

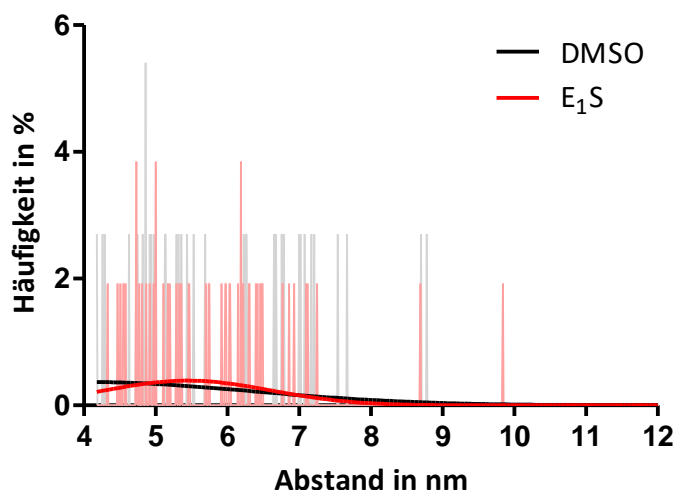
Die errechneten Werte für *S4-FIAsh-OATP2B1-ECFP* umfassen 7,3 nm für DMSO und 6,3 nm für  $E_1S$ . Der im 3D-Modell erhobene Wert lag mit 5,1 nm darunter (vgl. Diagramm 29).



**Diagramm 29: Abstandsberechnung *S4-FIAsh-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembranomänen (blau), der vierten intrazellulären Schleife mit dem TC-Motiv (rot) sowie dem C-terminal gebundenen ECFP (cyan). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus mit dem Übergang zum ECFP ist dunkelgrau. Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.



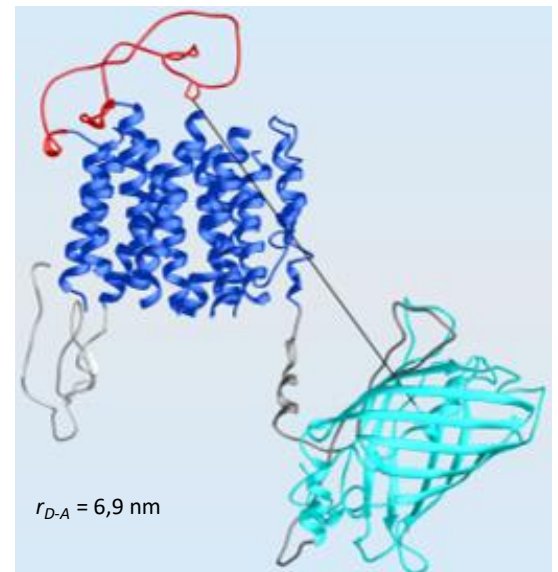
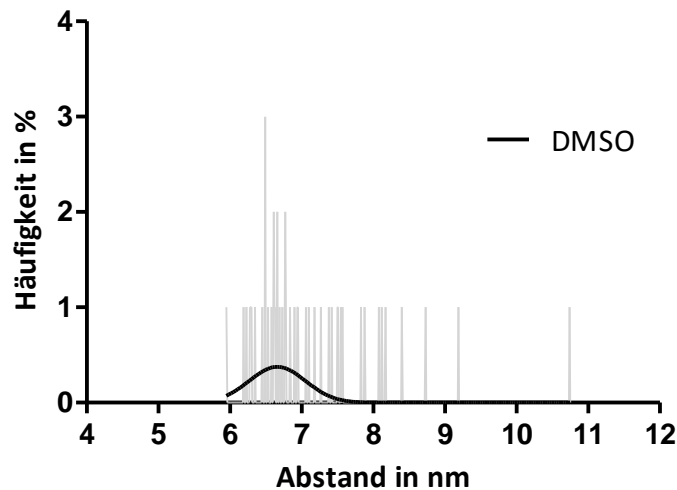
Für *S5-FIAsh-OATP2B1-ECFP* wurden Werte von 4,0 nm für DMSO und 5,5 nm für  $E_1S$  errechnet. Der ausgemessene Abstand betrug 4,0 nm, er war also identisch mit dem berechneten DMSO-Wert (vgl. Diagramm 30).



**Diagramm 30: Abstandsberechnung *S5-FIAsh-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembranomänen (blau), der fünften intrazellulären Schleife mit dem TC-Motiv (rot) sowie dem C-terminal gebundenen ECFP (cyan). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus mit dem Übergang zum ECFP ist dunkelgrau. Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

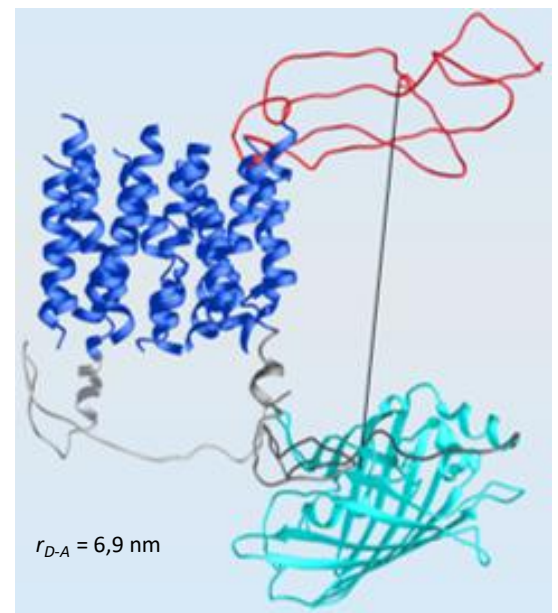
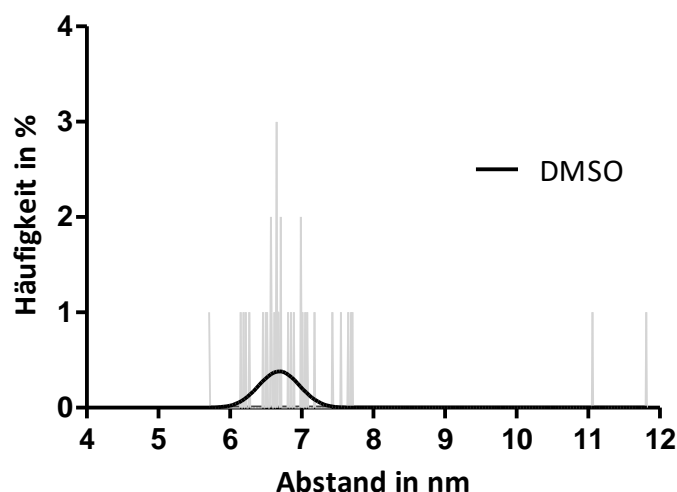


Auch für die Konstrukte mit dem TC-Motiv in den extrazellulären Schleifen wurde eine Berechnung durchgeführt. Hier errechnete sich für *EZS2-FIAsh-OATP2B1-ECFP* ein Abstand von 6,7 nm. Der ausgemessene Wert war mit 6,9 nm ähnlich (vgl. Diagramm 31).



**Diagramm 31: Abstandsberechnung *EZS2-FIAsh-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembrandomänen (blau), der zweiten extrazellulären Schleife mit dem TC-Motiv (rot) sowie dem C-terminal gebundenen ECFP (cyan). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus mit dem Übergang zum ECFP ist dunkelgrau. Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

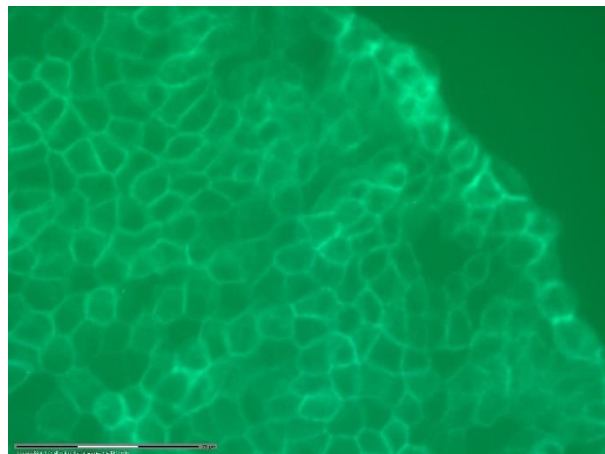
Für *EZS5-FIAsh-OATP2B1-ECFP* wurde ein Abstand von 6,7 nm berechnet. Im 3D-Modell gemessen wurde eine Distanz von 6,9 nm (vgl. Diagramm 32). Damit wurden für beide Konstrukte mit der extrazellulären Markierung identische Werte erhoben.



**Diagramm 32: Abstandsberechnung *EZS5-FIAsh-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembrandomänen (blau), der fünften extrazellulären Schleife mit dem TC-Motiv (rot) sowie dem C-terminal gebundenen ECFP (cyan). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus mit dem Übergang zum ECFP ist dunkelgrau. Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.

### 3.5 Etablierung und Charakterisierung einer *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP*-stabil-exprimierenden Zelllinie

Wie die vorangegangenen Charakterisierungen der *EYFP*- und *FIAsh-OATP2B1*-Fusionsproteine gezeigt haben, konnte lediglich für das *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP*-Konstrukt sowohl eine Transportaktivität als auch eine modifizierbare FRET-Effizienz nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde das Hauptaugenmerk im weiteren Verlauf der Arbeit auf dieses Fusionsprotein gelegt. Es wurde daher stabil in MDCKII-Zellen überexprimiert und daraufhin weitergehend charakterisiert (ein entsprechender Versuch wurde auch für das Konstrukt *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* unternommen, wobei jedoch keine stabil exprimierenden Zellen isoliert werden konnten). Bei *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP* konnte bereits während der Isolation der transfizierten Klone festgestellt werden, dass sich die Sortierung des Proteins im Gegensatz zu den transient transfizierten Zellen hin zur Zellmembran verschoben hatte. Abbildung 31 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des zur Charakterisierung verwendeten Klons unmittelbar vor der Isolation.

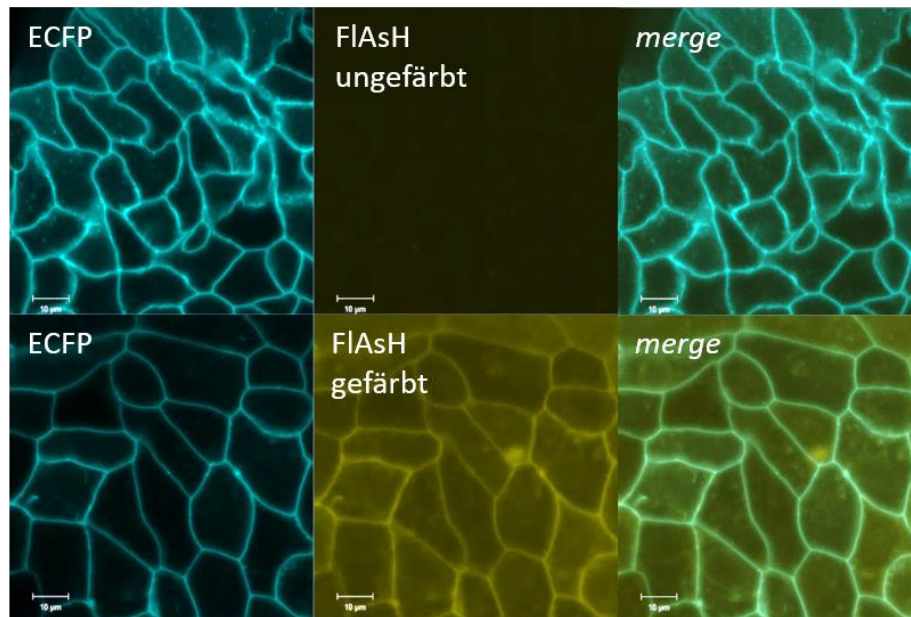


**Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahme des *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP*-Stabiltransfektanten.** Die Aufnahme erfolgte etwa eine Woche nach der Aufteilung der transfizierten Zellen auf Zellkulturschalen. Dazu genutzt wurde das Mikroskop Observer.Z1 (40x Objektiv) und das FITC-Filterset.

#### 3.5.1 Lokalisation

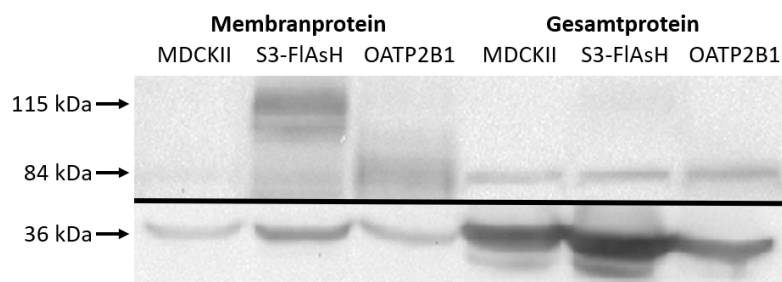
Wie bereits während der Isolation des Klons festzustellen war, zeigten die *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP*-Zellen eine optimale Lokalisation des Transporters in der Zellmembran. Es zeigte dahingehend dieselben Eigenschaften wie das *OATP2B1-ECFP*. Dieser Befund wurde konfokalmikroskopisch für beide Fluorophore bestätigt (vgl. Abbildung 32).





**Abbildung 32: Lokalisation *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* in stabil transfizierten MDCKII-Zellen.** Das Protein ist in der Zellmembran lokalisiert. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der Aussaat der Zellen mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FIAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Dabei wurde je eine Aufnahme vor (obere Reihe) bzw. nach (untere Reihe) der Anfärbung der Zellen mit FIAsH-EDT<sub>2</sub> angefertigt.

Zusätzlich zu den mikroskopischen Aufnahmen wurde ein Western-Blot durchgeführt, der die Proteinverteilung in der Membranfraktion sowie im Gesamtprotein zeigen soll. Im Vergleich zu den *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Zellen wurden auch das Wildtyp-OATP2B1 sowie MDCKII-Zellen aufgetragen (vgl. Abbildung 33). Der Blot bestätigt die mikroskopischen Bilder und zeigt das *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* (115 kDa, OATP2B1 + ECFP) in gleicher Verteilung wie das Wildtyp-OATP2B1 (84 kDa).

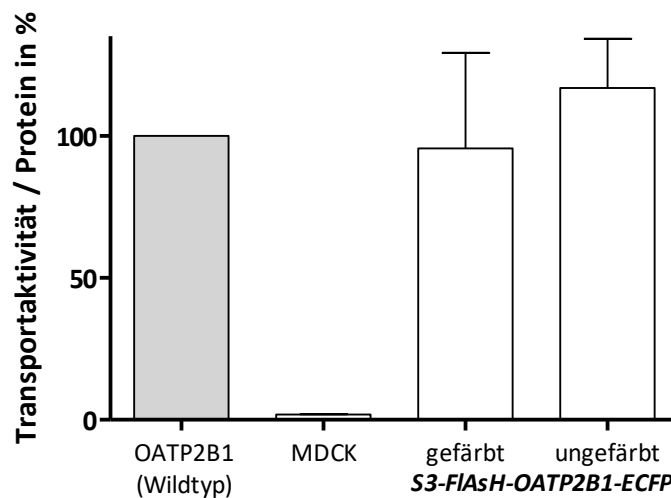


**Abbildung 33: Western-Blot des *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Stabiltransfektanten.** Aufgetragen sind jeweils 50 µg, wobei die linke Gruppe die Membranproteinfraktion und die rechte Gruppe das Gesamtprotein präsentieren. Es sind in jeder Gruppe untransfizierte MDCKII-Zellen, der *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP*-Stabiltransfektant (*S3-FIAsH*) sowie MDCKII-Zellen, die das Wildtyp-OATP2B1 überexprimieren (*OATP2B1*), aufgetragen. Im oberen Teil wurde der Blot mit dem primären OATP2B1-Antikörper und dem sekundären HRP-konjugierten IgG-Antikörper (Kaninchen) behandelt. Im unteren Teil wurde er anschließend mit dem primären GAPDH-Antikörper und dem sekundären HRP-konjugierten IgG-Antikörper (Maus) behandelt. Die Bande bei 115 kDa markiert das *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP*, jene bei 84 kDa das Wildtyp-OATP2B1. Die Banden 36 kDa sind das GAPDH.

### 3.5.2 Funktion

Wie in den transient transfizierten Zellen zeigte das *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* Konstrukt auch nach stabiler Transfektion Transportaktivität. Weiterhin wurde diese auch in Gegenwart des

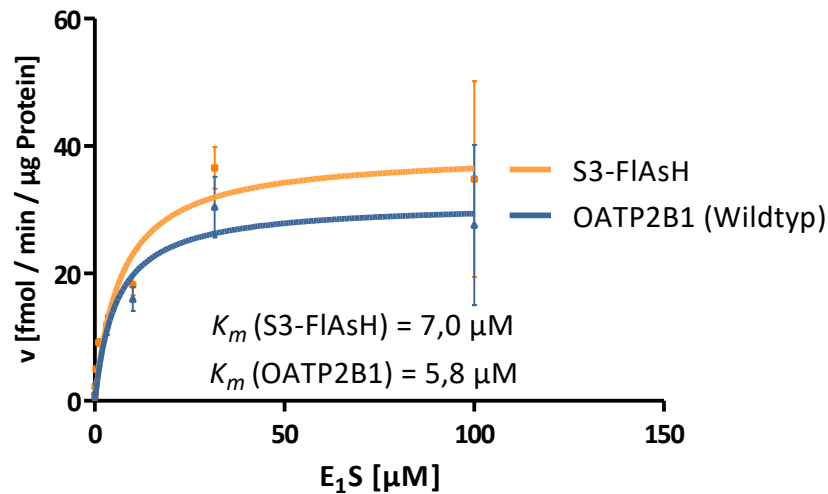
Farbstoffs FIAsH-EDT<sub>2</sub> untersucht, wobei keine Beeinflussung der Transportaktivität festgestellt werden konnte (vgl. Diagramm 33).



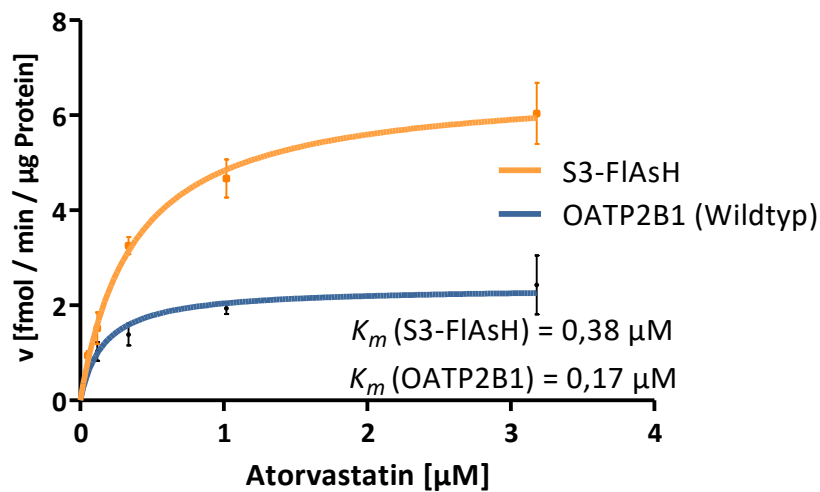
**Diagramm 33: Darstellung der Transportaktivität des S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP.** Gezeigt ist die Aufnahme von Tritium-markiertem Estron-3-sulfat (E<sub>1</sub>S, 5 nM) in stabil transfizierten MDCKII-Zellen bzw. untransfizierten MDCKII-Zellen über eine Dauer von 5 min. Die bestimmte Aktivität ist auf den Gesamtproteingehalt bezogen und prozentual dargestellt, wobei das Wildtyp-OATP2B1 als 100 % normiert ist. (Mittelwerte + SD, n = 3)

Zusätzlich zum Nachweis der Transportaktivität erfolgte für die stabil transfizierten Zellen die Bestimmung einiger kinetischer Parameter des OATP2B1. Es wurden dabei die Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ ) für E<sub>1</sub>S und Atorvastatin sowie die halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) für Atorvastatin bestimmt. Als Vergleich dienten wiederum die mit dem Wildtyp-OATP2B1 stabil transfizierten MDCKII-Zellen.

Für das Substrat E<sub>1</sub>S konnte ein  $K_m$  von 7,0  $\mu$ M (KI: 2,07 – 11,95  $\mu$ M) für S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP und 5,8  $\mu$ M (KI: 1,76 – 9,86  $\mu$ M) für das Wildtyp-OATP2B1 bestimmt werden. Dabei lagen die Maximalgeschwindigkeiten ( $V_{max}$ ) bei 39,05 (KI: 31,65 – 46,45  $\frac{fmol}{min}/\mu g$ ) bzw. 31,11  $\frac{fmol}{min}/\mu g$  (KI: 25,48 – 36,73  $\frac{fmol}{min}/\mu g$ ) Gesamtprotein (vgl. Diagramm 34). Die  $K_m$  für Atorvastatin ergaben 0,38  $\mu$ M (KI: 0,27 – 0,48  $\mu$ M) für S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP und 0,17  $\mu$ M (KI: 0,06 – 0,27  $\mu$ M) für das Wildtyp-OATP2B1. Als  $V_{max}$  wurden 6,64 (KI: 6,05 – 7,24  $\frac{fmol}{min}/\mu g$ ) bzw. 2,38  $\frac{fmol}{min}/\mu g$  (KI: 1,99 – 2,77  $\frac{fmol}{min}/\mu g$ ) Gesamtprotein bestimmt (vgl. Diagramm 35). Die Berechnung der  $IC_{50}$  von Atorvastatin ergab Werte von 0,87  $\mu$ M (KI: 0,73 – 1,03  $\mu$ M) für S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP und 0,52  $\mu$ M (KI: 0,41 – 0,67  $\mu$ M) für Wildtyp-OATP2B1 (vgl. Diagramm 36).

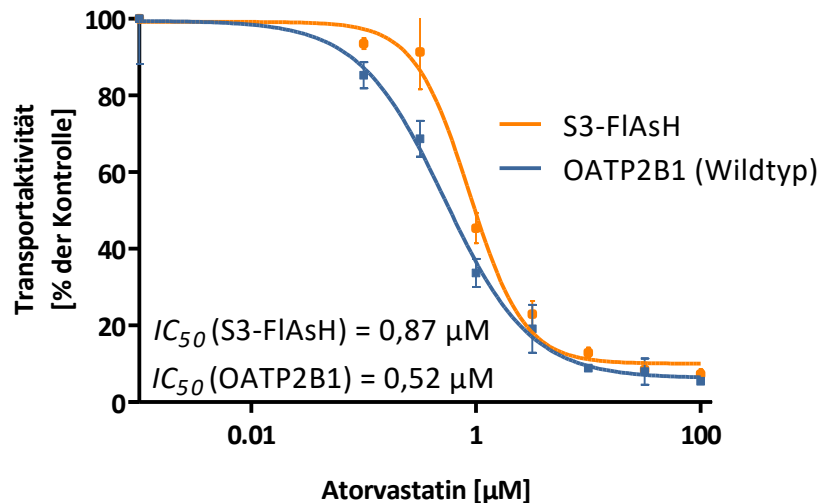


**Diagramm 34: Bestimmung des  $K_m$  für  $E_1S$ .** Beim Versuch wurden die Zellen für 5 min mit steigenden Konzentrationen von  $E_1S$  (0 – 100  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ Ci/mL) behandelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, inklusive der nichtlinearen Regressionsgeraden (Michaelis-Menten). Die bestimmte Aktivität ist auf den Gesamtproteingehalt bezogen.



**Diagramm 35: Bestimmung des  $K_m$  für Atorvastatin.** Beim Versuch wurden die Zellen für 5 min mit steigenden Konzentrationen von Atorvastatin (0 – 3,18  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ Ci/mL) behandelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, inklusive der nichtlinearen Regressionsgeraden (Michaelis-Menten). Die bestimmte Aktivität ist auf den Gesamtproteingehalt bezogen.



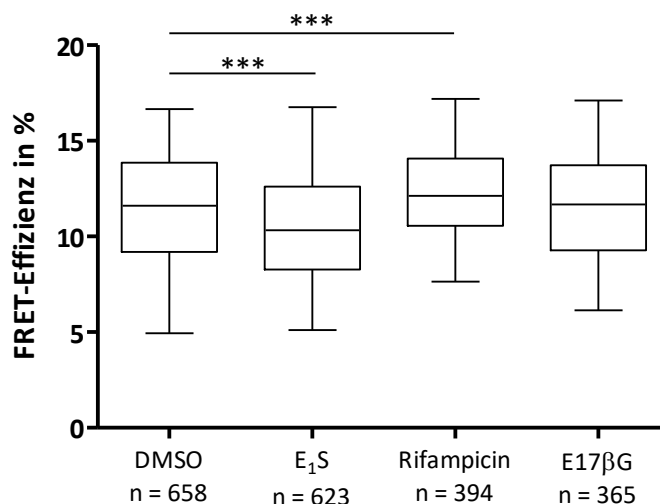


**Diagramm 36: Bestimmung der  $IC_{50}$  für Atorvastatin.** Beim Versuch wurden die Zellen für 5 min mit steigenden Konzentrationen von Atorvastatin (0 – 100  $\mu$ M) zzgl. Tritium-markiertem  $E_1S$  (1 $\mu$ M, 0,25  $\mu$ Ci/mL) behandelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SD, inklusive der nichtlinearen Regressionsgeraden (halblogarithmisch [Inhibitor]), bezogen auf 100 % als Ausgangsaktivität. Die bestimmte Aktivität ist auf den Gesamtproteingehalt bezogen.

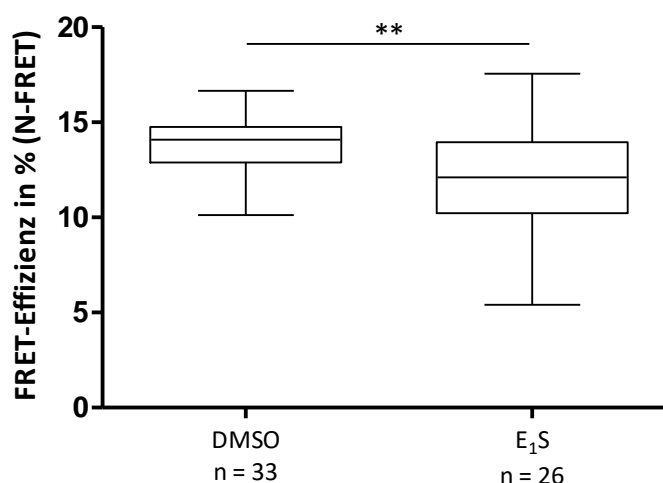
### 3.5.3 FRET-Effizienz

Nachdem die Beeinflussung der FRET-Effizienz für *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* durch  $E_1S$  bereits in transient transfizierten Zellen gezeigt werden konnte, wurden nun auch die stabil transfizierten Zellen hinsichtlich ihrer FRET-Effizienz charakterisiert. Zusätzlich zum  $E_1S$  wurden diese mit dem Inhibitor Rifampicin und dem Nicht-OATP2B1-Substrat E17 $\beta$ G vermessen (vgl. Diagramm 37). Es zeigte sich eine im Vergleich zum transient transfizierten Konstrukt leicht verringerte basale FRET-Effizienz (11,44 %  $\pm$  3,0, in Gegenwart von DMSO). Die Abnahme der FRET-Effizienz in Gegenwart von  $E_1S$  (10,46 %  $\pm$  2,8) um etwa 1 % absolut und 8,6 % relativ war jedoch auch hier zu beobachten. Umgekehrt kam es unter Gabe von Rifampicin (12,25 %  $\pm$  2,3) zu einem leichten Anstieg der FRET-Effizienz, während E17 $\beta$ G (11,52 %  $\pm$  2,8) keinen Einfluss hatte.

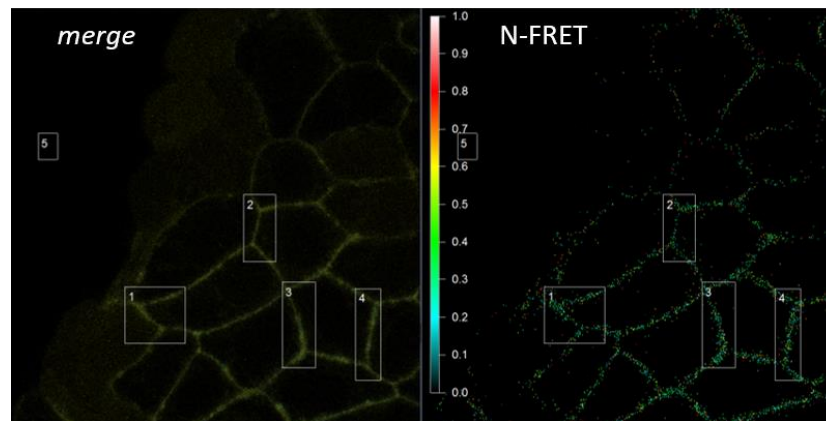
Zur Kontrolle des Effektes wurden die stabil transfizierten Zellen auch mittels *sensitized emission* vermessen (vgl. Diagramm 38). Auch hier zeigten sich ähnliche Effekte wie beim *photobleaching*: In Gegenwart von  $E_1S$  (11,94 %  $\pm$  3,3) war die FRET Effizienz um etwa 13 % (relativ) geringer als bei der DMSO Kontrolle (13,72 %  $\pm$  1,5). Die Messwerte (FRET) fielen dabei insgesamt etwas höher aus als beim *photobleaching*. Abbildung 34 zeigt ein generiertes FRET-Bild sowie die zugehörige *merge*-Aufnahme der stabil transfizierten Zellen. Die FRET-Signale erscheinen dabei nur in der Zellmembran.



**Diagramm 37: photobleaching des stabil transfizierten S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP.** Gemessen mit IP zzgl. DMSO (0,1 %), E<sub>1</sub>S (10 μM), Rifampicin (10 μM) oder E17βG (10 μM). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der Aussaat der Zellen mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FlAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau:  $p < 0,001$  (\*\*\*).



**Diagramm 38: sensitized emission des stabil transfizierten S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP.** Gemessen mittels sensitized emission mit IP zzgl. DMSO (0,1 %) bzw. E<sub>1</sub>S (10 μM). Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der Aussaat der Zellen mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Zwei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm) und FlAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm). Boxplot-Darstellung mit Whiskern vom Minimum zum Maximum. Ungepaarter t-Test (zweiseitig), Signifikanzniveau:  $p < 0,001$  (\*\*\*).

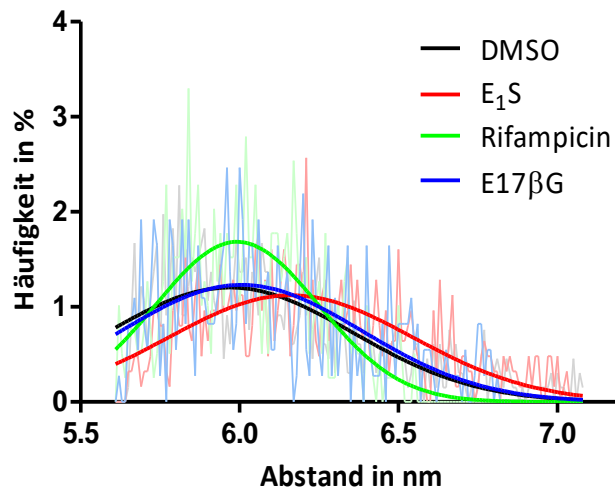


**Abbildung 34: Aufnahme des Stabiltransfektanten mittels *sensitized emission*.** Gezeigt ist die *merge*-Aufnahme sowie das daraus berechnete FRET-Bild für N-FRET von *S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP*-Stabiltransfektanten. Die gesetzten ROI sind beispielhaft für die beim Versuch verwendeten. Die Aufnahme erfolgte 24 h nach der Aussaat der Zellen mittels LSM 780 (100x Objektiv) als Drei-Kanal-Bild mit ECFP-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 459 – 514 nm), FlAsH-Kanal (Ex. 514 nm, Em. 515 – 646 nm) und FRET-Kanal (Ex. 458 nm, Em. 515 – 646 nm).

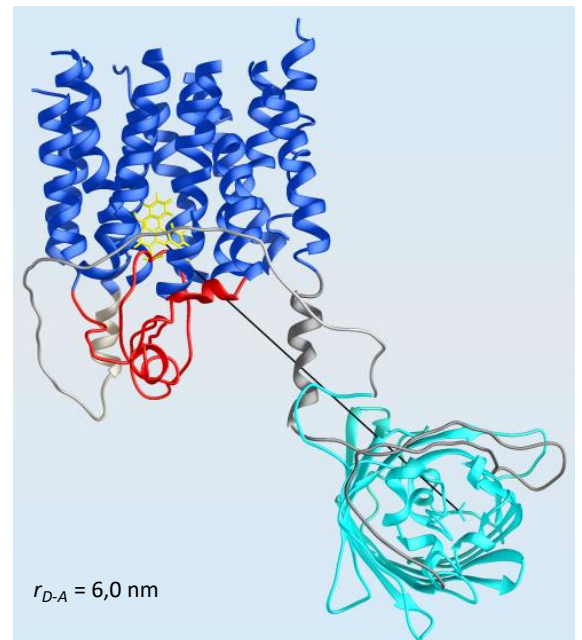
### 3.5.4 *In silico*-Analyse

Auch für die FRET-Messungen der stabil transfizierten Zellen wurde eine *in silico*-Analyse durchgeführt. Dabei erfolgte die Berechnung der Abstände aus den FRET-Effizienzen analog zu denen der transient transfizierten *FlAsH-OATP2B1-ECFP*-Fusionsproteine (3.4.4). Aufbauend auf dem bereits gezeigten 3D-Modell dieses Konstruktes wurde ein weiteres erstellt, das den Fluoreszenzfarbstoff FlAsH-EDT<sub>2</sub> in seiner potenziellen Bindung an das TC-Motiv in der dritten intrazellulären Schleife darstellt. Entsprechend wurde der Abstand nicht ausgehend vom Prolin, sondern vom O-10 des FlAsH-EDT<sub>2</sub> zum C-4 des Leucin-64 im ECFP gemessen.

Die Mittelwerte der Gauß-Verteilungskurven der Abstände ergaben Werte von 5,97 nm für DMSO, 6,16 nm für E<sub>1</sub>S, 5,99 nm für Rifampicin und 6,01 nm für E17βG. Der im 3D-Modell gemessene Wert war mit 6,0 nm im Mittel wiederum fast identisch mit den errechneten Werten (vgl. Diagramm 39).



**Diagramm 39: Abstandsrechnung *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* sowie dessen 3D-Modell.** Links: Häufigkeitsverteilung der anhand der FRET-Effizienzen berechneten Abstände sowie ihre Gauß-Verteilungskurven. Rechts: 3D-Modell mit den Transmembrandomänen (blau), der dritten intrazellulären Schleife mit dem TC-Motiv (rot), dem gebundenen FIAsH-EDT<sub>2</sub> (gelb) sowie dem C-terminal gebundenen ECFP (cyan). Der N-Terminus ist hellgrau, der C-Terminus mit dem Übergang zum ECFP ist dunkelgrau. Der Abstand  $r_{D-A}$  ist durch die schwarze Linie markiert.



## 4 Diskussion

Die angenommene Struktur und der prognostizierte Mechanismus der OATPs boten die Grundlage zur Erstellung mehrerer Hypothesen, die sich mittels Förster-Resonanzenergietransfers beantworten lassen könnten. Zum einen wäre die Möglichkeit gegeben, aufgrund der Abstandsabhängigkeit von FRET die Abstände innerhalb des Transporters zu ermitteln. Des Weiteren könnte der Beweis erbracht werden, dass sich die ermittelten Abstände in Anwesenheit verschiedener Substanzen ändern. Die Ausprägung dieser Abstandsänderungen könnte weiterhin experimentell erbrachte Hinweise für den Transportmechanismus liefern. Voraussetzung hierfür ist, dass sich die OATPs insoweit mit FRET-geeigneten Fluorophoren modifizieren lassen, ohne dass sie dabei ihre funktionellen Eigenschaften verlieren. Dies sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand des Vertreters OATP2B1 getestet werden. Dazu wurden mehrere FRET-Fusionsproteine des OATP2B1 hergestellt und diese mit gängigen FRET-Messmethoden charakterisiert. Zusätzlich wurden die Fusionsproteine auch hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften untersucht.

### 4.1 Bewertung der etablierten FRET-Methoden

Um die hergestellten Fusionsproteine hinsichtlich ihrer FRET-Eigenschaften untersuchen zu können, standen mit dem Akzeptor-*photobleaching* und dem *sensitized emission* zwei unterschiedliche Methoden zur Auswahl.

Als Medium für die Messungen wurde der Inkubationspuffer gewählt, der auch für Transporterassays genutzt wurde. Damit war sichergestellt, dass die Bedingungen der Transportversuche auch für die FRET-Messungen vorlagen. Ein Unterschied zu den Transporterassays und damit der wahrscheinlich größte Nachteil der Messungen am LSM 780 war die fehlende Möglichkeit die Temperatur zu kontrollieren. Zwar stand eine Temperiereinrichtung zur Verfügung, allerdings wies diese baulich bedingt keine Eignung für die verwendeten Kammerdeckgläser auf. Es konnte in einem Nebenversuch allerdings gezeigt werden, dass auch bei RT unter sonst gleichen Bedingungen ein Transport stattfindet (Daten nicht gezeigt). Es kann also davon ausgegangen werden, dass unter den für die mikroskopischen Messungen gewählten Parametern (IP mit 37 °C hinzugefügt, max. 30 min Messzeit) ein Transport stattfinden kann.

Bei der eigentlichen Etablierung der FRET-Messungen konnte zunächst mittels beider Methoden ein FRET-Signal für die verwendeten Positiv-Kontrollen detektiert werden. Dabei lagen die

Mittelwerte der FRET-Effizienzen für die *ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle* bei 21,11 % für das *photobleaching* und bei 14,67 % für das *sensitized emission*. Der mittels *photobleaching* ermittelte Werte für die FRET-Negativkontrollen Werte um 0 % ermittelt, während mittels *sensitized emission* ein Wert von 4,99 % für die ECFP-EYFP-Negativkontrolle gemessen wurde. Zur Bewertung dieser Ergebnisse muss zunächst geklärt werden, welche Werte theoretisch möglich und daher zu erwarten gewesen wären. Broussard et al. (2013) nennen für Kontrollen aus zwei Fluoreszenzproteinen eine Spanne der FRET-Effizienz von 10 – 40 %. In diese Region fallen auch die in dieser Arbeit gemessenen Werte der Positivkontrollen. Theoretische Überlegungen stützen dabei diese Einschätzung. So wurde analog zu Müller et al. (2013) das ECFP ausgemessen, wobei sich vom Chromophor des ECFP (Leucin-64 bis Glycin-67) bis zu dessen N-Terminus ein Abstand von 2,2 nm und zum C-Terminus von 2,7 nm ergab. Zur nächsten Aminosäure im umgebenden  $\beta$ -Fass wurde ein Abstand von 1,1 nm gemessen. Paart man die Abstände nun mit denen des strukturverwandten EYFP, kommt man auf einen minimalen Abstand von 2,2 nm bei einer parallelen Anordnung von ECFP und EYFP, 4,4 nm wären es bei kollinearer Anordnung und mindestens 5,4 nm bei orthogonaler Ausrichtung beider Fluorophore zueinander. Hinzu kommen noch, je nach Ausrichtung, 1,5 – 3 nm der dazwischenliegenden Verbindung aus 27 Aminosäuren. Zusammenfassend wären also theoretisch Werte zwischen 3,7 nm und 8,4 nm möglich. Da das Molekül frei beweglich im Zytoplasma vorliegt und so bei der Messung alle Zustände miterfasst werden, wird entsprechend der Mittelwert von 6,05 nm als am realistischsten angenommen. Anhand der gemessenen FRET-Effizienzen lassen sich im Mittel für das *photobleaching* ein Abstand von 5,95 nm und für das *sensitized emission* 6,4 nm errechnen. Die Mittelwerte beider Methoden weichen damit nicht wesentlich ( $< 0,5$  nm) von dem möglichen theoretischen Wert ab, wobei das *photobleaching* den etwas näherliegenden Wert lieferte. Der Vergleich macht deutlich, dass trotz des vermeintlich großen Unterschiedes der gemessenen FRET-Effizienzen (30 % relativ) der Einfluss auf die Abstände nur geringfügig ausfällt (5 % relativ). Ein weitaus gravierenderer Unterschied wurde bei der Messung der Negativ-Kontrolle (*pECFP-N1* und *pEYFP-N1* doppelt transfiziert) festgestellt. Hier zeigte nur das *photobleaching* die erwartungsgemäßen Werte um 0 %, was einem Abstand von über 10 nm entspricht, also außerhalb des FRET-sensitiven Bereiches. Dagegen wurde mittels *sensitized emission* ein nicht unerheblicher Wert von etwa 5 % erfasst, was

rechnerisch einem Abstand von immerhin 7,8 nm entspricht. Die Erfassung dieses falsch positiven Wertes kann verschiedene Ursachen haben. Auf Molekülebene ist vorstellbar, dass es durch die hohe Expression beider Moleküle zufällig zu Zusammenlagerungen kommt. Dadurch wäre die räumliche Nähe erfüllt und FRET möglich. Dies müsste allerdings für beide Methoden gelten. Wahrscheinlicher ist deshalb, dass der Fehler aus der Berechnung herrührt. Betrachtet man dazu die Etablierung der Methode nach Xia ( $N_{FRET}$ ), lässt sich feststellen, dass Xia et al. (2001) für ihre verwendete Negativ-Kontrolle ebenfalls nicht 0 % ermitteln konnten. Auch bei ihnen traten Werte von bis zu 6 % auf, aber nur 1 % im Mittel. Da Xia et al. ihren Wert im Vergleich zu ihren Positivkontrollen nicht als FRET auslegen, ist davon auszugehen, dass beim *sensitized emission* mit einem entsprechenden Messfehler gerechnet werden muss. Dieser könnte beispielsweise durch Pixelartefakte verursacht werden, welche die Berechnung miteinfasst. Ob das *sensitized emission* die FRET-Effizienz in der Folge, auch in Hinsicht auf die Positiv-Kontrolle, immer zu hoch angibt, ist allerdings nicht zu klären. Vor allem weil es sich bei der Positiv-Kontrolle um intramolekularen FRET handelt und bei der Negativ-Kontrolle um intermolekularen FRET handeln würde, scheinen die Ergebnisse ohnehin nur bedingt miteinander vergleichbar zu sein. Obwohl damit deutlich wird, dass das *photobleaching* wesentlich robuster ist, muss auch hier mit einem Messfehler gerechnet werden. In der Etablierung wurde deutlich, dass es innerhalb der Versuchsdauer zu einer detektierbaren Bewegung der Zellen kam. Als Indiz dafür diene bereits die Stichprobenmessung der ECFP-Einzelprobe. Diese zeigte, obwohl der Theorie nach gar nicht möglich, bereits fast 1 % FRET-Effizienz. Bei der visuellen Einzelauswertung der Bilder konnte beobachtet werden, wie die Zellen vereinzelt Flächenausdehnung zeigten. Dies führte zu einer größeren Anzahl erfasster ECFP-Moleküle, was einen Intensitätsanstieg und ein falsch-positives FRET-Signal zur Folge hatte. Analog dazu lagen auch einzelne Werte der mittels *photobleaching* vermessenen Negativ-Kontrollen im positiven Bereich. Letzteres ließe sich dabei aber wiederum durch die zufällige Zusammenlagerung der Einzelmoleküle erklären, wie es schon beim *sensitized emission* angesprochen wurde. Vogel et al. (2006) konnten dies beispielsweise auch für membrangebundene Proteine feststellen, die jeweils mit einem Donor oder Akzeptor markiert waren. Diese zeigten standardmäßig 5 % FRET-Effizienz, wenn sie in der gleichen Membran exprimiert waren. Vogel et al. stellen in diesem Zusammenhang auch noch einen weiteren grundlegenden Punkt fest. Die Bewertung der Genauigkeit einer FRET-Methode lässt sich ohne international etablierte FRET-Standards, deren FRET-Effizienz bekannt ist, nicht korrekt bewerten. Daher sollten

FRET-Effizienzen nur methodenspezifisch und kontextbezogen bewertet werden. Es ist also möglich, dass verschiedene Methoden für ein und dieselbe Probe unterschiedliche FRET-Effizienzen ergeben. Ein Ausdruck hiervon ist die sehr breite Auswahl an Berechnungsmöglichkeiten der FRET-Effizienzen oder aber alternativ genutzter FRET-Indizes (z.B. N-FRET) wie sie von Berney et al. (2003) zusammengefasst werden.

Vor diesem Hintergrund muss als Limitation dieser Arbeit festgehalten werden, dass die erhobenen FRET-Effizienzen aus den spezifischen Messmethoden hervorgegangen sind und die Werte mangels Literaturangaben zu den verwendeten Konstrukten lediglich anhand von 3D-Modellen und den Kristallstrukturen der Fluoreszenzproteine und verwandter Transporter der *major facilitator superfamily* bewertet werden können.

## 4.2 Charakterisierung der OATP2B1-Fusionsproteine

### 4.2.1 Herstellung der OATP2B1-Fusionsproteine

Zur Herstellung der OATP2B1-FRET-Konstrukte wurden aus der Vielzahl verfügbarer Fluorophore zwei Kombinationen für die intramolekularen FRET-Messungen ausgewählt. Als Donor wurde dabei grundsätzlich das Fluoreszenzprotein ECFP genutzt, das C-terminal mit dem OATP2B1 verknüpft wurde. Das ECFP stellt eine Weiterentwicklung des GFP dar, bei dem das Fluoreszenzspektrum durch gezielten Aminosäureaustausch in den kurzwelligeren Bereich verschoben wurde. Darüber hinaus ist ECFP im Vergleich zu GFP stärker fluoreszierend und besser löslich. Als Protein besitzt es eine molekulare Masse von 31 kDa, was etwa einem Drittel der des OATP2B1 (84 kDa) entspricht. Die Integration eines solchen vergleichsweise großen Moleküls stellt eine wesentliche Modifikation im Vergleich zum Wildtyp-OATP2B1 dar. Dies wird vor allem auch bei der Betrachtung des Strukturmodells für das *OATP2B1-ECFP* deutlich, das beide Moleküle mit kaum zu differenzierender räumlicher Ausdehnung zeigt. Es musste deshalb zunächst geklärt werden, inwieweit die Integration des ECFP die Charakteristika des OATP2B1 beeinflusst. Köck et al. (2010) konnten bereits feststellen, dass die C-terminale Fusion von GFP an das OATP2B1 zu keiner Beeinflussung der Transportfunktion führt. Aufgrund der Strukturverwandtschaft zum GFP wurde dies auch für das ECFP erwartet. Tatsächlich war das *OATP2B1-ECFP* in der Zellmembran lokalisiert und zeigte volle Transportaktivität. Das *OATP2B1-ECFP* eignete sich daher für weitere Modifikationen mit dem FRET-Partner EYFP oder dem zur Bindung von FIAsH-EDT<sub>2</sub> notwendigen Tetracystein-Motiv.



Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden als Akzeptor eingesetzten Fluorophoren EYFP und FIAsh-EDT<sub>2</sub> ist deren Größe. Dabei besitzt das EYFP, das ebenfalls durch Aminosäureaustausch aus dem GFP hervorging, nahezu die gleichen Struktureigenschaften wie das ECFP. Entsprechend müssen für EYFP die gleichen Bedenken im Hinblick auf die Beeinflussung der Funktion des *OATP2B1-ECFP* durch das Einbringen eines so großen Moleküls berücksichtigt werden. Hinsichtlich der Größe ist das FIAsh-EDT<sub>2</sub> zwar bevorteilt, allerdings konnte die Bedeutung von Cysteinen für die Struktur und Funktion am OATP2B1 selbst gezeigt werden. So führte der Austausch bereits eines der zehn Cysteine in der fünften extrazellulären Schleife des OATP2B1 entweder zu einer falschen Sortierung oder einer eingeschränkten Transportfunktion. (Hänggi et al. 2006). Daher ist auch durch das Einfügen der vier zur Bindung des FIAsh-EDT<sub>2</sub> notwendigen Cysteine nicht auszuschließen, dass diese die Funktion, Struktur oder Lokalisation des Transporters beeinflussen (Hoffmann et al. 2010). Diese potenziellen Einschränkungen beider Akzeptoren mussten aber letztlich mangels Alternativen hingenommen werden. Einzig in Bezug auf ihre Lokalisation innerhalb der *OATP2B1-ECFP*-Struktur konnte Einfluss genommen werden. Die Entscheidung, das Hauptaugenmerk hier auf die intrazellulären Schleifen zu legen, hatte zwei wesentliche Gründe. Zum einen sollte dadurch sichergestellt werden, dass der Zugang zur Substratbindestelle von extrazellulär unbehindert blieb, zum anderen sollte eine Modifikation innerhalb der intrazellulären Schleifen aufgrund ihrer räumlichen Nähe zum C-Terminus auch ein stärkeres FRET-Signal hervorbringen. Zusätzlich würden beide Fluorophore in einer Ebene liegen und eine Konformationsänderung daher eine stärkere Veränderung des FRET-Signals bewirken können, wenn sie sich auseinander bewegen. Betrachtet man die Ausprägung der intrazellulären Schleifen, fällt auf, dass diese bis auf die 3. IZS (72 AS) nur aus 8 – 12 AS bestehen (Meier-Abt et al. 2005). Das bedeutet, dass selbst bei der Integration des vermeintlich kleinen TC-Motivs (6 AS) zwangsweise bis zu 75 % der nativen AS ausgetauscht werden müssen. Das Ansinnen, möglichst viele AS zu erhalten, war Fluorophor-bedingt also nur eingeschränkt möglich. Zwar wurden für die Integration des EYFP nur wenige Nukleotide mutiert, um die notwendigen Restriktionsschnittstellen zu erhalten, allerdings stellt die Integration des EYFP insgesamt eine starke Modifikation des Transporters dar. So haben die finalen Fusionsproteine nach Integration von FRET-Donor und -Akzeptor im Falle der *EYFP-OATP2B1-ECFP*-Konstrukte eine Masse von 146 kDa gegenüber den 84 kDa des unmodifizierten OATP2B1. Sie sind also fast doppelt so groß. Gerade auch weil das EYFP die benachbarten IZS sterisch beeinflussen könnte, sind nicht nur Funktionsbeeinträchtigungen

durch eine mangelnde Ausprägung der Substratpore, sondern auch beispielsweise Störungen bei der Phosphorylierung intrazellulär gelegener Aminosäuren nicht auszuschließen. Ganz ähnlich sieht die Betrachtung der Integration in die zwei gewählten extrazellulären Schleifen 2 und 5 aus, die beide als Träger konservierter AS identifiziert wurden (Hagenbuch und Meier 2003; Hänggi et al. 2006). Aus diesem Grund könnte deren Modifikation auch mit Einschränkungen der Funktion verbunden sein, obwohl wiederum auf eine Beibehaltung der bestehenden AS Rücksicht genommen wurde.

#### 4.2.2 Lokalisation und Funktion der OATP2B1-Fusionsproteine

Tatsächlich bestätigten die durchgeführten Charakterisierungen der Fusionsproteine die Vorüberlegungen. So konnte für keines der Konstrukte eine ausschließliche Sortierung in die Zellmembran nachgewiesen werden, wie es noch bei dem *OATP2B1-ECFP* beobachtet wurde. Insbesondere die eigentlich kleineren FIAsh-Konstrukte waren überwiegend nicht in der Zellmembran zu finden. Es ist daher davon auszugehen, dass jedwede Modifikation der intra- oder extrazellulären Schleifen die Sortierung stören kann. Das *EZS5-EYFP-OATP2B1-ECFP* Konstrukt konnte dabei überhaupt nicht überexprimiert werden. Das Ausmaß der Beeinträchtigung hängt also zum einen von der Art des Fluorophors und zum anderen von der Position ab, da sowohl innerhalb der EYFP- bzw. FIAsh-Gruppe Unterschiede gefunden wurden. Allerdings galt dies nur für die transienten Transfektionen. Denn interessanterweise führte die stabile Überexpression des *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP*-Konstrukts zu einem anderen Ergebnis. Hier zeigte sich eine dem Wildtyp vergleichbare Funktion und Lokalisation des Konstrukts. Die Gründe für die unterschiedliche Sortierung zwischen stabiler und transients Transfektion liegen wahrscheinlich in den vielfältigen post-translationalen Sortierungsmechanismen, die für die korrekte Sortierung in die Zellmembran verantwortlich sind (Brown und Breton 2000). In den Fokus ist dabei unter anderem das PDZK1 gerückt, dessen Bindungsmotiv auch am C-Terminus innerhalb der OATPs nachgewiesen werden konnte. Seine Bedeutung zeigte sich unter anderem beim *Oatp1a1*, das bei PDZK1-knock-out-Mäusen keine Sortierung in die Plasmamembran der Hepatozyten mehr zeigte (Wang et al. 2005). Umgekehrt konnte im Zellmodell bei einer Überexpression von PDZK1 nachgewiesen werden, dass der Transporter OATP1A2 vermehrt in die Zellmembran gelangte (Zheng et al. 2014). Daraus könnte nun geschlussfolgert werden, dass bei der Überexpression des Transporters die Menge an vorhandenen PDZK1-Proteinen nicht ausreicht, um den Sortierungsprozess für alle gebildeten Proteine zu ermögli-

chen. Dadurch ließe sich erklären, dass nur ein Teil der Fusionsproteine ihren Zielort, die Zellmembran, erreicht und alle übrigen intrazellulär verbleiben. Aufbauend hierauf könnte vermutet werden, dass die Menge des gebildeten Fusionsproteins in den stabil transfizierten Zellen im Vergleich zu den transienten transfizierten wesentlich geringer ist. Dies würde eine Erklärung liefern, warum die stabil transfizierten Zellen eine membranäre Sortierung zeigen. Die Menge an Fusionsprotein und PDZK1 liegen in einem passenden Verhältnis vor, das diese Sortierung ermöglicht. Warum das transient transfizierte *OATP2B1-ECFP* von der fehlerhaften Sortierung ausgenommen war, kann am Ende jedoch nicht geklärt werden, da die genauen Sortierungsmechanismen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

Aufschluss über die verbliebene Transportfunktion der transient transfizierten Fusionsproteine brachten die durchgeführten Transporterassays. Diese bestätigten zum großen Teil die Erkenntnisse der Lokalisationsanalyse, da alle bis auf zwei Konstrukte keine Transportaktivität mehr zeigten. Die beiden Konstrukte, deren Substrataufnahme signifikant über den MDCKII-Kontrollzellen lagen, waren dabei jeweils jene, deren Modifikation in der dritten intrazellulären Schleife stattfand. Da zumindest im Rahmen der transienten Transfektion auch diese Konstrukte nur eine unwesentlich bessere Lokalisation in der Zellmembran zeigten, lässt sich die fehlende Transportaktivität der anderen Konstrukte nicht allein über die Lokalisation erklären. Im Allgemeinen scheint die Modifikation der 3. IZS aber weniger erhebliche Folgen zu haben, als die der anderen Schleifen. Der wahrscheinlichste Grund hierfür liegt in deren Größenunterschied, da der geringere Einfluss einer Modifikation der weitaus größten und flexibelsten intrazellulären Schleife nachvollziehbar erscheint. Weil die Strukturgegebenheiten und der Einfluss auf die Transportfunktion jedoch nicht im Einzelnen bekannt sind, kann über die genaue Ursache für jedes einzelne Konstrukt allerdings nur spekuliert werden.

Konzentriert man sich auf die beiden transportaktiven Konstrukte ist festzustellen, dass das *S3-EYFP-OATP2B1-ECFP* nur einen unwesentlichen Teil der ursprünglichen Transportaktivität zeigt (23 %), wohingegen die des *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* bei 87 % liegt und sich nicht signifikant vom Wildtyp-*OATP2B1* unterscheidet. Es ist daher anzunehmen, dass es bei beiden Konstrukten zu einer ungehinderten Substratbindung, aber nur zu einem eingeschränkten Transport bei dem EYFP-Konstrukt kommt. Ursächlich ist hierfür vermutlich die Größe des EYFP-Moleküls, das eine ungehinderte Öffnung der Substratpore nach intrazellulär verhindert oder

zumindest einschränkt. Es ist außerdem vorstellbar, dass das EYFP allgemein die Geschwindigkeit der für den Transport notwendigen Konformationsänderung herabsenkt und so über die gewählte Zeit des Transporterassays weniger Transportzyklen ablaufen können. Schlussendlich ging aus diesen Versuchen jedoch das *S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP* als das für weitere Untersuchungen am besten geeignete FRET-Konstrukt hervor, wobei im Wesentlichen die Lokalisation und Funktion als Vergleichsmaßstab verwendet wurden. Die mit diesem Konstrukt stabil transfizierten Zellen wurden anschließend eingehend charakterisiert. Dabei waren vor allem diverse Funktionsparameter von Interesse. Zunächst wurde getestet, ob das Färbereagenz FlAsH-EDT<sub>2</sub> einen Einfluss auf die Transportaktivität hat. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-OATP2B1 und dem *S3-FlAsH-OATP2B1-ECFP*, mit und ohne Färbereagenz, festgestellt werden. Weiterhin wurden die kinetischen Parameter für Estron-3-Sulfat ( $K_m$ ) und Atorvastatin ( $K_m$  und  $IC_{50}$ ) bestimmt. Dabei war der  $K_m$  für Estron-3-Sulfat vergleichbar mit dem des Wildtyp-OATP2B1. Auch die  $IC_{50}$  für Atorvastatin lag im Bereich der des Wildtyptransporters. Die größte Abweichung wurde beim  $K_m$  für Atorvastatin festgestellt. Hier lag der Wert für das FRET-Konstrukt mehr als doppelt so hoch im Vergleich zum Wildtyp. Es kann daher zwar nicht ausgeschlossen werden, dass die Integration des TC-Motivs die kinetischen Eigenschaften des Transporters beeinflusst, allerdings scheinen diese Effekte zumindest für die getesteten OATP2B1-Substrate eher begrenzt zu sein. Es ist daher davon auszugehen, dass der Transport mechanistisch nicht völlig abweichend vom Wildtyp-OATP2B1 abläuft.

### 4.2.3 FRET-Effizienz der OATP2B1-Fusionsproteine

Unabhängig von den dargestellten Einschränkungen hinsichtlich der Transportaktivität und Lokalisation wurden alle FRET-Konstrukte auch in Bezug auf ihre FRET-Effizienz charakterisiert. Es konnte für die meisten Konstrukte ein FRET-Signal detektiert werden, wobei die Effizienz von Konstrukt zu Konstrukt unterschiedlich war. Vor dem Hintergrund des prognostizierten Modells für die Anordnung des OATP2B1 in der Membran nach Meier-Abt et al. (2005) ist hier die FRET-Effizienz in Abhängigkeit der Position des FRET-Akzeptors von Interesse, da aus den FRET-Effizienzen Rückschlüsse auf die Abstände innerhalb des Moleküls gewonnen werden können. Zunächst zeigt die Detektion der Fluoreszenzproteine, dass sie im Fusionsprotein korrekt gefaltet vorliegen, da eine Fluoreszenz nur dann möglich ist, wenn ihre Tertiärstruktur komplett ausgebildet ist (Craggs 2009). Darauf aufbauend lässt sich vermuten, dass die strukturelevanten Elemente (z.B. Cysteine) der Fluoreszenzproteine keine Interaktion mit denen

des OATP2B1 eingehen. Gleiches gilt auch für das TC-Motiv, das offenbar keine Disulfidbindungen mit den Cysteinen des OATP2B1 eingeht, da es sich sonst nicht mit FIAsh-EDT<sub>2</sub> markieren ließe. Es ist daher möglich, dass auch das OATP2B1 zumindest in seiner Struktur keiner gegenseitigen Beeinflussung durch die Fluorophore ausgesetzt ist. Es ist dennoch relativ wahrscheinlich, dass die Integration der Fluorophore, insbesondere des größeren EYFP, nicht nur die Konformationsänderung des OATP2B1 behindert. Hierfür spricht die zumindest im transienten Überexpressionmodell fehlende Transportfunktion und veränderte Lokalisation. Nichtsdestotrotz sind die Konstrukte für FRET-Messungen geeignet. Für die EYFP-Konstrukte lagen dabei die mittels *photobleaching* erhobenen FRET-Effizienzen, abhängig von der Lokalisation des EYFP, zwischen 1,15 – 9,02 %, während für die FIAsh-Konstrukte Werte von 4,97 – 20,12 % gemessen wurden. Damit wurden mit FIAsh als FRET-Akzeptor im Schnitt etwas mehr als doppelt so hohe FRET-Effizienzen gemessen. Damit umspannten sie Werte zwischen denen der Negativ-Kontrollen mit 0 % und denen der Positivkontrollen mit 21,11 % (ECFP-EYFP-Positivkontrolle) bzw. 14,69 % (FIAsh-ECFP-Positivkontrolle). Aufgrund der im vorherigen Diskussionspunkt angesprochenen Problematik der Vergleichbarkeit von FRET-Messungen ist es kaum möglich, die erhobenen Werte mit existierenden Literaturangaben zu vergleichen. Dies hängt aber vor allem auch damit zusammen, dass es keine intramolekularen FRET-Messungen in vergleichbaren Transportern gibt. Allerdings sind Ergebnisse aus FRET-Untersuchungen an der bakteriellen Lactose-Permease verfügbar (Majumdar et al. (2007)). Da für die bakterielle Lactose-Permease eine Strukturverwandtschaft zum OATP2B1 angenommen wird, dienen sie der vorliegenden Arbeit als Basis zur Interpretation der Strukturberechnungen und die Bewertung der FRET-Daten des OATP2B1. Abweichend von den Modifikationen, die am OATP2B1 vorgenommen wurden, erfolgte die Markierung der Permease über einzelne eingebrachte Cysteine jeweils am Ende der Transmembrandomänen zur zytoplasmatischen Seite (TMD 3 und 12) oder zur periplasmatischen Seite (TMD 5 und 11) mithilfe von Alexa Fluor-Farbstoffen (488 und 647). Es unterscheiden sich damit also nicht nur die Positionen der eingebrachten Fluorophore, sondern auch die Fluorophore selbst sehr deutlich von den in dieser Arbeit genutzten FRET-Partnern und ihren Eigenschaften. Des Weiteren erfolgten die Messungen an der Lactose-Permease am einzelnen Molekül (*single molecule*-FRET, smFRET). Entsprechend deutlich fallen auch die Unterschiede der gemessenen FRET-Effizienzen aus. So wurden für die Permease FRET-Effizienzen von 27,9 – 55,2 % je nach Konstrukt ermittelt. Es

erscheint daher sinnvoller nicht die FRET-Effizienzen, sondern die sich daraus ergebenden Distanzen zu einem Vergleich heranzuziehen. Deren Berechnung berücksichtigt die verschiedenen Eigenschaften der Fluorophore und führt so zu einem unabhängigen Ergebnis. Bis auf die für die FRET-Paare spezifischen Parameter (vgl.  $R_0$  nach Formel 2) erfolgte die Distanzberechnung in dieser Arbeit nach Majumdar et al. (vgl. Formel 1). Eine potenzielle Fehlerquelle bei der Distanzberechnung stellt dabei der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  dar. Dieser wurde sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch von Majumdar et al. als  $\frac{2}{3}$  angenommen. Wie einleitend beschrieben, kann er jedoch theoretisch Werte zwischen 0 – 4 einnehmen. Da insbesondere das C-terminal gebundene ECFP in einem gewissen Rahmen frei beweglich ist, muss angenommen werden, dass der Orientierungsfaktor während der Molekülbewegung nicht konstant bleibt. Dies wird schon in den 3D-Modellen deutlich, in denen ECFP und EYFP in nahezu jeder Darstellung eine andere Orientierung aufweisen. Da in dieser Arbeit aber ohnehin mehrere Moleküle gleichzeitig vermessen wurden, erscheint der Mittelwert von  $\frac{2}{3}$ , der für frei bewegliche Moleküle angenommen wird, als hinreichend genau. Hier wäre auch die von Khrenova et al. (2015) vorgeschlagene Kalkulation des Übergangsdipolmomentes zur Berechnung von  $\kappa^2$  kaum zielführend, da schlichtweg keine exakten Kenntnisse über die tatsächliche Struktur der Fusionsproteine gegeben sind. Zusammenfassend ist deshalb als Limitation zu nennen, dass die erfassten FRET-Effizienzen nicht immer auf unterschiedliche Distanzen zurückzuführen sind, sondern wahrscheinlich auch auf eine Änderung der Orientierung der Fluorophore zueinander. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass die gezeigten Unterschiede der Distanzen nur unter Annahme einer im Mittel gleichbleibenden Orientierung der Fluorophore zutreffend sind. Da dieser Umstand jedoch für alle Konstrukte gleichermaßen gilt, sollte er insbesondere beim internen Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit keine entscheidende Einflussgröße sein. Zur besseren Übersicht der anhand der FRET-Ergebnisse nach Formel 1 berechneten und den in den 3D-Modellen ausgemessenen Distanzen fasst Tabelle 12 diese noch einmal zusammen.

**Tabelle 12: Berechnete und gemessene Distanzen nach FRET-Paar und Position.**

FRET-Paar	Distanz (jeweils in nm)	S1	S2	S3	S4	S5	EZS2	EZS5
EYFP/ECFP	berechnet	7,53	8,6	7,57	6,98	7,18	9,9	
	gemessen	3,3	3,1	4,7	4,6	7,0	8,4	
FIAsH/ECFP	berechnet		7,24	5,88	7,3	4,0	6,7	6,7
	gemessen		5,5	6,0	5,1	4,0	6,9	6,9

Beim Vergleich der berechneten und gemessenen Distanzen fällt auf, dass zwar die Größenordnung in etwa gleich ist, es jedoch teils mehr als doppelt so hohe Unterschiede gibt. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die unvollständige Darstellung der EYFP-Konstrukte ohne ECFP und einer zu gering gemessenen Distanz zwischen alternativ genutztem C-Terminus des OATP2B1 zur modifizierten Schleife. Ebenso ohne Übereinstimmung sind die absoluten Unterschiede der Schleifen untereinander zwischen berechneten und gemessenen Werten. Hier erreichen die berechneten Werte der intrazellulären Schleifen maximal Unterschiede von etwa 1,6 nm, während die gemessenen Werte Unterschiede von bis 3,9 nm offenbaren. Der Vergleich macht deutlich, dass die Anwendung der 3D-Modelle für die Interpretation der erhobenen FRET-Effizienzen nur bedingt geeignet ist. Zudem fällt auf, dass die berechneten 3D-Modelle teils eine fehlerhafte Faltung der Transporter aufweisen. Ob dies nun der Realität entspricht und damit eine potenzielle Begründung für die beobachteten Funktionseinbußen darstellt, kann in Ermangelung von Kristallstrukturen nicht beantwortet werden. Da die berechneten Werte auf tatsächlich erhobenen Daten und keiner Simulation basieren, ist schlussendlich aber davon auszugehen, dass sie der Wahrheit näherkommen. Die geringen Distanzunterschiede innerhalb der Gruppe der EYFP-Konstrukte gründen vermutlich auf der Größe der Fluoreszenzproteine, deren räumliche Ausdehnung eine nur unwesentliche Variation in der Positionierung zulässt. Dadurch sind sie sich immer ähnlich nah, ganz egal in welcher intrazellulären Schleife sie sich nun befinden. Majumdar et al. errechneten im Mittel einen Abstand von 5,4 nm zwischen ihren Fluorophoren am Ende der Transmembrandomänen. Unter der genannten Annahme, dass die Positionen in den IZS für das EYFP vernachlässigbar sind, würde sich hier ein mittlerer Abstand von 7,7 nm ergeben. Das bedeutet einen Unterschied von 2,3 nm. Beim Vergleich mit den im vorherigen Diskussionspunkt bestimmten Abständen zwischen den Fluoreszenzproteinen der Positiv-Kontrolle entspricht dieser Unterschied in etwa dem Abstand der Proteine, wenn sie sich parallel berühren. Die Daten lassen also vermuten, dass die Fluoreszenzproteine in den EYFP-Konstrukten am häufigsten parallel zueinander ausgerichtet sind. Die  $\beta$ -Fass-Strukturen ragen also z.B. senkrecht von der Zellmembran weg ins Zytosol, vorausgesetzt der Transporter befindet sich in der Membran. Das Ergebnis des EZS2-Konstruktes (9,9 nm) entspricht daneben im Wesentlichen den Erwartungen einer Negativ-Kontrolle für die OATP2B1-Fusionsproteine, als welche das Konstrukt konzipiert wurde. Die Abstände erscheinen hier bereits im 3D-Modell (8,4 nm) am Rande des FRET-sensitiven Bereichs (10 nm). Dies bestätigt sich in der Messung durch FRET-Effizienzen knapp über 0 %.

Im Gegensatz zu den EYFP-Konstrukten stimmen die berechneten Werte der FIAsh-Konstrukte bis auf zwei Ausnahmen ziemlich exakt ( $\leq 0,2$  nm) mit den aus den 3D-Modellen abgeleiteten Werten überein. Dies gilt im besonderen Maße für die Variante mit dem FIAsh in der dritten intrazellulären Schleife (S3). Diese entspricht damit, zumindest stabil transfiziert, nicht nur den funktionellen Anforderungen des gesuchten OATP2B1-FRET-Modellkonstrukts, sondern hält auch der *in silico*-Analyse stand. Die Differenzen zwischen den beiden nicht übereinstimmenden Werten für S2 und S4 legen nahe, dass die 3D-Modelle für diese Konstrukte nur bedingt zutreffen und das tatsächliche Molekül wahrscheinlich in anderer Struktur vorliegt. Anders als bei den EYFP-Konstrukten wiesen die FIAsh-Konstrukte untereinander teilweise Abstandsunterschiede von bis zu 3,3 nm auf. Da bei den FIAsh-Konstrukten davon auszugehen ist, dass das FIAsh als viel kleineres Molekül eine sensitivere Differenzierung der Abstände zwischen den Schleifen zulässt, eignen sich die hier erhobenen Daten eher zu einer Interpretation der FRET-Unterschiede entsprechend der Positionierung als dies bei den EYFP-Konstrukten der Fall war. Betrachtet man die in der Einleitung gezeigte prognostizierte Sekundärstruktur der OATPs (Abbildung 2A) lässt sich vereinfacht feststellen, dass die intrazellulären Schleifen 1 und 5 dem C-Terminus am nächsten sind, gefolgt von den IZS 2 und 4 und letztlich der IZS 3, die dem C-Terminus gegenüberliegen sollte. Berücksichtigt man nun außerdem die Größe der einzelnen IZS, ist anzunehmen, dass die IZS 3 als einzige weit ins Zytoplasma ragt. Die anhand der FRET-Effizienzen errechneten Abstände stimmen nun dahingehend überein, dass IZS 5 den geringsten Abstand zeigt und die IZS 2 und 4 mit etwa dem gleichen Abstand als Paar vorliegen. Allerdings würde nach diesen Daten die IZS 3 näher am C-Terminus liegen als IZS 2 und 4, was sich allerdings durch ihre Größe erklären lässt. Sie ragt nicht nur weiter ins Zytosol hinein, sondern auch näher zum C-Terminus bzw. dem ebenfalls ins Zytosol ragenden ECFP hin. Unter dieser Annahme stützen die hier erhobenen Daten damit die vorausgesagte ringförmige Anordnung um eine zentrale Pore. Darüber hinaus lässt sich mithilfe des größten Abstandes der Schleifen zum ECFP ungefähr die horizontale Ausdehnung des Transporters abschätzen. Berücksichtigt man die Ausdehnung des ECFP, wie im vorherigen Diskussionspunkt ausgeführt, ergäben sich unter Abzug der genannten 1,1 – 2,7 nm vom maximal erfassten Abstand der IZS 4 (7,3 nm) eine Spanne von 4,6 – 6,2 nm. Diese liegt im Bereich der durch Abramson et al. (2003) anhand der Kristallstruktur der bakteriellen Lactose-Permease ermittelten Spanne von 30 – 60 Å bzw. 3 – 6 nm. Schließt man nun noch die Ergebnisse der EZS-Konstrukte mit ein, lässt sich auch die vertikale Ausdehnung schätzen. Hier ergaben sich überraschenderweise



identische Werte für beide Konstrukte. Da beide markierten EZS relativ groß sind, ist auch hier davon auszugehen, dass sie sich aufgrund ihrer Beweglichkeit im Mittel in einem gleichen Abstand zum C-Terminus befinden müssen. Berücksichtigt man auch hier die Ausdehnung des ECFP kommt man auf eine vertikale Ausdehnung von 4 – 5,6 nm. Auch diese Spanne trifft in etwa die von Abramson et al. bestimmte vertikale Ausdehnung von 60 Å bzw. 6 nm, wenn man berücksichtigt, dass die Fluorophore nicht am äußersten Rand des Transporters liegen. Damit lässt sich zusammenfassen, dass die über die FRET-Messungen bestimmten Abstände – unter Berücksichtigung der genannten Limitationen – zumindest mithilfe der FLASH-Konstrukte zu einer Strukturaufklärung geeignet erscheinen. Sie eignen sich damit beispielsweise, um Modelle zu überprüfen oder zu validieren. Die Integration des EYFP bringt zwar verwertbare FRET-Signale hervor, allerdings führt die Größe des Fluoreszenzproteins letztlich immer zu Einschränkungen, weshalb der Einsatz für künftige Untersuchungen nicht empfohlen werden kann. Um noch präzisere Daten zu erhalten, wäre außerdem die Messung an einem einzelnen Molekül mit einem zeitlich besser auflösenden Mikroskop von Vorteil.

### 4.3 FRET zur Testung der Transportaktivität

Kernziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Transporterfunktion mit einer veränderten FRET-Effizienz assoziiert ist und dies sich eignet, die Interaktion des Transporters mit seinen Substraten oder Inhibitoren zu charakterisieren. Damit sollte außerdem gezeigt werden, inwieweit die durch Majumdar et al. mittels FRET nachgewiesenen substratinduzierten Konformationswechsel für die bakterielle Lactose-Permease auch auf das OATP2B1 zu übertragen sind. Da für alle hergestellten Konstrukte ein FRET-Signal erfasst werden konnte, wurden die Konstrukte mit den Modifikationen in den intrazellulären Schleifen auch in Gegenwart des OATP2B1-Substrats Estron-3-Sulfat untersucht. Unter der Annahme des von Huang et al. (2003) beschriebenen *Rocker-switch*-Mechanismus ist davon auszugehen, dass OATPs ohne gebundenes Substrat in ihrer stabilsten Konformation mit einer von außen zugänglichen Substratbindungsstelle vorliegen. Da die durchgeführten FRET-Messungen immer mehrere Transporter auf einmal erfassen, ist jedoch nicht sichergestellt, dass sich zum Zeitpunkt der Messung alle in dieser Konformation befinden. Es ist vielmehr anzunehmen, dass die Messungen immer mehrere Konformationen oder Fluorophororientierungen auf einmal erfassen. Der Unterschied zwischen den Messungen mit oder ohne Substanz besteht letztlich darin, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der nach intrazellulär geöffneten, substratfreisetzenden Konformation zunimmt, sobald das Substrat einen Konformationswechsel induziert hat und

durch die zentrale transloziert ist. Entsprechend sollte sich, wie auch durch Majumdar et al. gezeigt, die Häufigkeitsverteilung der Konformationen (FRET-Effizienzen oder Abstände als Surrogat) zu der intrazellulär geöffneten verschieben. Zur Interpretation geben Tabelle 13 und Tabelle 14 noch einmal eine Übersicht der Daten, wobei auf die Messungen mit dem OATP-Inhibitor Rifampicin und 17 $\beta$ -Estradiol-3-glucuronid, das nicht mit OATP2B1 interagiert, gesondert eingegangen wird (Grube et al. 2007; Letschert et al. 2006).

**Tabelle 13: Gemessene und berechnete Parameter nach Substanzgabe (EYFP-Konstrukte).**

Parameter	Substanz	S1	S2	S3	S4	S5
FRET-Effizienz in %	DMSO	5,75	2,93	5,43	9,02	7,7
	E <sub>1</sub> S	5,66	2,41	5,85	10,15	7,16
Unterschied	absolut	0,09	0,52	0,42	1,13	0,54
	relativ	- 1,57 %	- 17,75 %	+ 7,73 %	+ 12,53 %	- 7,01 %
Abstand in nm	DMSO	7,53	8,6	7,57	6,98	7,18
	E <sub>1</sub> S	7,55	8,85	7,5	6,72	7,26
Unterschied	absolut	0,02	0,25	0,07	0,26	0,08
	relativ	+ 0,27 %	+ 2,91 %	- 0,92 %	- 3,72 %	+ 1,11 %

**Tabelle 14: Gemessene und berechnete Parameter nach Substanzgabe (FIAsH-Konstrukte)**

Parameter	Substanz	S2	S3	S4	S5
FRET-Effizienz in %	DMSO	4,97	13,61	6,49	20,66
	E <sub>1</sub> S	10,69	12,26	9,57	19,61
Unterschied	absolut	5,72	1,35	3,08	1,05
	relativ	+ 115,09 %	-9,92 %	+ 47,46 %	-5,08 %
Abstand in nm	DMSO	7,24	5,88	7,3	
	E <sub>1</sub> S	6,44	6,02	6,3	
Unterschied	absolut	0,80	0,14	1,00	
	Relativ	- 11,05 %	+ 2,38 %	- 13,7 %	

Die Ergebnisse legen eine wesentliche Gemeinsamkeit von EYFP- und FIAsH-Konstrukten offen. Bei beiden weisen jeweils die Konstrukte mit dem Akzeptor in der 2. und 4. Intrazellulären Schleife die höchste Änderung der FRET-Effizienz unter Substratgabe auf. Unterschiedlich sind

jedoch die Effektstärken und auch die Tendenz bei den S2-Konstrukten. Der Grund für die insgesamt geringeren FRET-Veränderungen bei den EYFP-Konstrukten liegt vermutlich in der Größe des EYFP, das, wie bereits zuvor beschrieben, sterisch in so weit stabilisiert ist, dass es sich nur minimal bewegen kann. Bemüht man erneut die Paarung entlang der Pseudosymmetrieachse nach Abbildung 2A der IZS nach S1/S5, S2/S4 und S3 als dem C- und N-Terminus gegenüberliegend, lässt sich für die EYFP-Konstrukte nur teilweise eine übereinstimmende Tendenz feststellen. Die beiden dem C-Terminus am nächsten gelegenen IZS 1 und 5 erfahren die geringste Veränderung aller Paare. Dies ist dahingehend nachvollziehbar, da sie sich während des Transportes nicht vom C-Terminus wegbewegen sollten. Tatsächlich nähern sie sich ihm bzw. dem ECFP sogar minimal an. Die IZS 2 und 4 bewegen sich absolut zwar über fast die gleiche Strecke, allerdings in verschiedene Richtungen. Entsprechend ihrer Paarung wäre hier eine gleiche Richtung zu erwarten gewesen. Ebenfalls abweichend ist die Bewegung der IZS 3, deren Abstand zum C-Terminus nicht wie angenommen zunimmt, sondern im Gegenteil eher geringer wird. Mit den EYFP-Konstrukten ist der postulierte *Rocker-switch*-Mechanismus also nicht zu bestätigen. Aufgrund der fehlenden Funktionalität der EYFP-Konstrukte muss also davon ausgegangen werden, dass die Integration des EYFP neben den anderen beschriebenen Folgen auch einen Einfluss auf die Konformationsänderung hat. Es scheint zwar eine Substratbindung zu erfolgen, die eine Konformationsänderung auslöst, allerdings entspricht diese nicht mehr der funktionellen. In der Folge war bei der Charakterisierung bis auf eine Ausnahme auch kein Transport nachzuweisen. Dem widerspricht, dass zumindest für das S3-EYFP-OATP2B1-ECFP ein Transport nachgewiesen werden konnte. Dieser ist allerdings, verglichen mit dem Wildtyp-OATP2B1 sehr gering, sodass auch hier anzunehmen ist, dass die Transport-bedingte Konformationsänderung nur in einem sehr eingeschränkten Maße stattfindet. Ähnlich unsystematisch waren auch die Effekte des Inhibitors Rifampicin, bzw. des nicht mit OATP2B1 interagierenden 17 $\beta$ -Estradiol-3-glucuronid für die EYFP-Konstrukte. Bei den IZS 2 und 3 führte Rifampicin zu einer dem E<sub>1</sub>S gleichgerichteten, allerdings von der Effektstärke noch stärkeren Veränderung der FRET-Effizienz. Umgekehrt war es bei den Konstrukten mit EYFP in den IZS 4 und 5. Hier kam es zu einer gegensätzlichen Veränderung der FRET-Effizienz im Vergleich zu E<sub>1</sub>S. Daraus kann man grundsätzlich schließen, dass Rifampicin bei allen Konstrukten zu binden scheint und die Konformation des Transporters verändert. Allerdings ist der Aussagegehalt dieser verschiedenen FRET-Veränderungen durch Rifampicin begrenzt.

Denn inwieweit diese Veränderungen spezifisch für einen Inhibitor sind, müsste mittels weiterer Inhibitoren getestet werden. Daraus ließe sich eventuell ein Muster ermitteln, nach dem es möglich ist, unbekannte Inhibitoren zu identifizieren. 17 $\beta$ -Estradiol-3-glucuronid verursachte keine signifikante Veränderung der FRET-Effizienz. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass OATP2B1 keine Glucuronide transportiert (Koenen et al. 2012). Der Versuch mit diesem ausgewiesenen Nicht-Substrat eignet sich daher als Negativ-Kontrolle für die FRET-Messung.

Im Gegensatz zu den EYFP-Konstrukten wiesen die FIAsh-Konstrukte S2 und S4 eine tendenziell ähnliche Veränderung ihrer FRET-Effizienz auf. Der substratinduzierte Unterschied der FRET-Effizienz bei *S5-FIAsh-OATP2B1-ECFP* entspricht der Erwartung, dass sich Schleife 5 beim Transport zusammen mit dem C-Terminus bewegt. Auch bei den FIAsh-Konstrukten ist auffallend, dass das einzig funktionell aktive Konstrukt *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP* nur eine sehr geringe Veränderung der FRET-Effizienz in Gegenwart des OATP2B1-Substrats E<sub>1</sub>S aufweist, allerdings stimmt die beobachtete Zunahme des Abstandes mit der Theorie des *Rocker-switch* Mechanismus überein. Insbesondere dieses letzte Konstrukt wirft hinsichtlich der transient transfizierten Konstrukte und ihrer unklaren Lokalisation in der Zellmembran die Frage auf, wie groß der Anteil der Transporter ist, die tatsächlich mit Substrat in Kontakt kommen. Sicherlich gelangt auch ein Teil durch Diffusion in die Zelle, wie viele intrazellulär gelegene Transporter aber dadurch versorgt werden können, bleibt unklar. Es kann also sein, dass nur ein Teil der Transporter die substratinduzierte Verschiebung der Konformationen erfährt und die FRET-Messung den Substrateffekt dahingehend unterschätzt. Gegen diese Annahme sprechen jedoch die Ergebnisse des stabil transfizierten *S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP*, dessen substratinduzierte Veränderung der FRET-Effizienz nur minimal (0,98 % absolut) stärker war, als die des transient transfizierten. Einen Unterschied gab es jedoch in der Gesamt-FRET-Effizienz zwischen transient und stabil transfiziertem Konstrukt. So waren die FRET-Effizienzen des transient transfizierten im Mittel 2 % (absolut) höher als die des stabil transfizierten. Die genaue Ursache hierfür kann nicht geklärt werden. Es wäre aber zu vermuten, dass in Folge der Überexpression und der intrazellulären Lokalisation des transient transfizierten Konstruktes vermehrt unspezifische intermolekulare Wechselwirkungen stattfinden und so zu leicht höheren Werten führen.

Hinsichtlich der beobachteten Veränderungen nach Substanzgabe bleibt weiterhin zu klären, wie ausgeprägt die substratinduzierten Veränderungen im Molekül zu erwarten sind. Majumdar et al. errechneten für die substratinduzierten Abstandsänderungen der Lactose-Permease eine Zunahme von 0,14 – 0,18 nm auf zytoplasmatischer Seite und eine Zunahme von 0,34 – 0,36 nm auf periplasmatischer Seite. Vor diesem Hintergrund erscheinen die für das stabil transfizierte *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* ermittelten Veränderungen von 0,19 nm nach E<sub>1</sub>S-Gabe durchaus realistisch. Dabei bleibt noch einmal anzumerken, dass es sich bei den erho-benen Werte um einen Mittelwert aller gemessenen Transporter handelt, sodass der tatsäch-lich erreichte Abstand während des Transportes wahrscheinlich unterschätzt wird. Nichtsdes-totrotz scheint der vorhergesagte Mechanismus durch das Ergebnis gestützt werden zu kön-nen. Weiterhin den Erwartungen entspricht die Vermessung mit E17βG. Hier zeigte auch das stabil transfizierte Konstrukt keine signifikante Veränderung der FRET-Effizienz. Für Rifampicin wurde zwar im Mittel ein kaum zu differenzierender Abstand ermittelt, allerdings wiesen die FRET-Effizienzen einen signifikanten Unterschied auf. Beim Vergleich der ermittelten Gauß-Verteilungskurven ist zu sehen, dass die der Werte unter Rifampicingabe eine erkennbar hö-here Amplitude im Vergleich zu allen anderen besitzt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Rifampicin die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Konformation erhöht. Als Inhibitor bin-det er also am Transporter, stabilisiert oder arretiert ihn in einer Konformation, die dem Mittel der Konformationen entspricht, die auch unter Gabe von DMSO oder dem Nicht-OATP2B1-Substrat E17βG auftreten. Wie schon bei den EYFP-Konstrukten beschrieben, bleibt zu klären, inwieweit dieser Effekt spezifisch für Inhibitoren ist. Für das stabil transfizierte *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* konnte schlussendlich also nicht nur eine substratinduzierte Konformations-änderung nachgewiesen werden, sondern auch ein Effekt durch Rifampicin bzw. ein fehlender Effekt durch E17βG gezeigt werden. Das Konstrukt entspricht damit den funktionellen Erwar-tungen und eignet sich zur Untersuchung mittels FRET. Bestätigt werden konnte ein Substrat-einfluss auch mittels *sensitized emission*, wobei die Absolutwerte ein wenig abwichen. Da be-reits die zum Vergleich der Messmethoden verwendeten Kontrollen eine Diskrepanz der Messwerte deutlich machten, ist diese auch beim OATP2B1-Konstrukt nicht überraschend. Von Interesse ist hierbei primär die Bestätigung des Substrateffekts auf die FRET-Effizienz (Ab-nahme in Anwesenheit von E<sub>1</sub>S).

Für eine potenzielle Screening-Methode wäre eine Messung nur durch *sensitized emission* möglich, da diese auch durch einfache Photometer durchgeführt werden könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen aber, dass die Änderungen der FRET-Effizienz in Gegenwart eines Substrates bzw. Inhibitors relativ gering sind. Da die Änderungen der FRET-Effizienz teilweise im Bereich des Grundrauschens (FRET-Effizienz des *pECFP*-Einzelvektors) lagen, war eine aussagekräftige Messung nur durch sehr hohe Stichprobengrößen zu erreichen. Zusammen mit der Notwendigkeit eines geeigneten Mikroskops und dem Aufwand der Messung stellt die gezeigte Methode dahingehend also noch keine wesentliche Verbesserung zu den etablierten Methoden zur Transportercharakterisierung dar. Vor diesem Hintergrund ist zu vermuten, dass eine Übertragung der Methode auf einen Multimode-Reader nicht oder nur mit einem sehr großen zusätzlichen Optimierungsaufwand möglich sein wird. Es kann daher geschlossen werden, dass die gezeigten Ergebnisse zwar als Grundlage für eine FRET-basierte Methode zur Charakterisierung von OATPs dienen könnten, dass für die Etablierung einer Hochdurchsatz-Screening-Methode die Unterschiede des FRET-Signals aber noch verstärkt werden müssten. Um dies zu erreichen, wäre zum einen die Verwendung von anderen Fluorophoren denkbar. Hier würden sich insbesondere noch weniger invasive Farbstoffe wie Alexa Fluor-Maleimide anbieten. Zum zweiten – und das würde die Nutzung der Alexa Fluor-Farbstoffe über einzelne Cysteine voraussetzen – wäre wiederum die Messung am einzelnen Molekül eine Möglichkeit die FRET-Signale noch besser zu erfassen.

#### 4.4 Limitationen

Wie bereits innerhalb der einzelnen Kapitel angeführt, sind für diese Arbeit einige Limitationen zu nennen. Da bislang keine FRET-Messungen an einem Vertreter der OATPs veröffentlicht wurden, sind Vergleiche der in dieser Arbeit erhobenen Daten nur mit denen verwandter Transporter möglich. Sie kann daher nur Hinweise über die Prozesse während des Transports oder die Struktur des Transporters OATP2B1 liefern. Beweise könnten hierzu beispielsweise Kristallstrukturanalysen erbringen. Nichtsdestotrotz erscheinen die Ergebnisse zumindest im Hinblick auf die verwandten Transporter schlüssig. Bezüglich der FRET-Effizienzen ist allerdings zu nennen, dass diese nur für die gewählten FRET-Paare innerhalb des dargestellten Messsystems zutreffend sein werden. Die anhand der FRET-Effizienzen ermittelten Distanzen sind allerdings weitgehend unabhängig zu bewerten und können daher zum Vergleich mit künftigen Messungen herangezogen werden. Letztlich konnte durch die FRET-Messung an-

hand unzählbarer Transporter auch nur ein Mittelwert der Zustände aller erfassten Transporter ermittelt werden. Hier wäre in Zukunft eine Einzelmolekülmessung denkbar. Weiterhin wäre hierdurch eventuell die Ermittlung der Konzentrations- oder Zeitabhängigkeit des Transports möglich, was mithilfe der in dieser Arbeit gezeigten FRET-basierten Testung der Transportfunktion nicht gelungen ist. Jedoch konnte mit dem Konstrukt *S3-FIAsH-OATP2B1-ECFP* bereits ein Fusionsprotein charakterisiert werden, das eine erwartungsgemäße Modifikation seiner FRET-Effizienz in Anwesenheit verschiedener Substanzen zeigte. Dieses könnte für künftige Einzelmolekülmessungen genutzt werden.

## 5 Zusammenfassung

Der Transport von Substanzen innerhalb eines Organismus stellt eine wesentliche Voraussetzung zur Aufrechterhaltung von Stoffwechselprozessen dar. Neben endogenen Stoffen unterliegen auch die meisten exogenen Substanzen zahlreichen Transportvorgängen, darunter auch die meisten Arzneistoffe. Deren Pharmakokinetik wird oft entscheidend von ihrer Affinität zu bestimmten Transportproteinen beeinflusst. Von diesen präsentiert neben den ABC-Transportern die Familie der SLC-Transporter das größte Spektrum einzelner Vertreter. Aufgrund ihrer Beteiligung sowohl an physiologischen als auch pharmakokinetischen Prozessen erweisen sich darunter die OATPs als besonders interessant. Obwohl deren Bedeutung am Stofftransport durch umfassende Charakterisierung ihrer Expression und Funktion unbestritten ist, erweist sich ihr zugrundeliegender Transportmechanismus noch immer als nicht vollständig verstanden. Jedoch bieten Untersuchungen an verwandten Transportern, wie der bakteriellen Lactose-Permease, Erkenntnisse, die sich möglicherweise auch auf die OATPs übertragen lassen. Für diese wurde ein *Rocker-switch*-Mechanismus vorausgesagt, bei dem die Bindung des Substrats zu einer Konformationsänderung führt. Hierdurch wird das Substrat entlang einer zentralen Pore durch das Transportprotein befördert. Eine Möglichkeit derartige Konformationsänderungen, die mit einer Verschiebung der Abstände innerhalb des Moleküls einhergehen, zu untersuchen, stellt der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) dar. Dieser beschreibt die strahlungslose Energieübertragung zwischen zwei Chromophoren, deren Effizienz mit dem Abstand der Chromophore zu- bzw. abnimmt.

Erstes Ziel dieser Arbeit war es OATP2B1, als einen Vertreter der OATPs, so zu modifizieren, dass er für die Untersuchung mittels FRET zugänglich werden würde. Dies erfolgte durch die Herstellung von OATP2B1-Fusionsproteinen, bei denen der Transporter mit den FRET-geeigneten Fluorophoren ECFP/EYFP bzw. ECFP/FlAsH ausgestattet wurde. Die Integration des ECFP erfolgte dabei jeweils am C-Terminus, während EYFP und FlAsH jeweils in die intrazellulären Schleifen des Proteins eingebracht wurden. Im Weiteren galt es, diese Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Funktion (Transport radioaktiv-markierter Substrate) und Lokalisation in der Zelle (Mikroskopie) zu charakterisieren. Hierbei wurde gezeigt, dass lediglich die Modifikation mit FlAsH in der dritten intrazellulären Schleife zu keiner Funktionsbeeinflussung führte und dieses Fusionsprotein auch als einziges eine membranäre Lokalisation aufwies. Der Schwer-



punkt lag jedoch auf der Messung der FRET-Effizienzen der Fusionsproteine mithilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Dabei konnte zunächst bei allen Fusionsproteinen ein FRET-Signal erfasst werden, das in Abhängigkeit der Position des FRET-Partners in der intrazellulären Schleife eine unterschiedliche Effizienz aufwies. Die FRET-basierte Berechnung der Abstände innerhalb des Moleküls brachte Ergebnisse hervor, die vergleichbar mit denen waren, die anhand von Kristallstrukturanalysen verwandter Transporter erhoben wurden. Teilweise Übereinstimmungen ergaben sich daneben auch beim Vergleich der berechneten Abstände mit denen computergestützter Modelle. Die Ergebnisse zeigen damit das Potenzial dieser Methode, die Struktur des OATP2B1 aufzuklären. Außerdem stützen sie zum Teil die prognostizierte Strukturverwandtschaft der OATPs zu der strukturell besser charakterisierten Lactose-Permease. Letztes Ziel war es zu untersuchen, ob sich die gemessenen FRET-Effizienzen durch Zugabe des OATP2B1-Substrats E<sub>1</sub>S beeinflussen ließen. Es konnte für fast alle Fusionsproteine eine Beeinflussung festgestellt werden, wobei die FRET-Effizienzen in Abhängigkeit von der Position des FRET-Partners sowohl ab- als auch zunahmen. Daneben zeigte auch die Zugabe des OATP2B1-Inhibitors Rifampicin eine verschieden ausgeprägte Beeinflussung. Die Zugabe des Nicht-OATP2B1-Substrats 17 $\beta$ -Estradiol-3-glucuronid führte zu keiner Beeinflussung. Die Ergebnisse zeigen damit eine substanzspezifische Beeinflussung des Fusionsproteins. Die berechneten Änderungen des Abstandes waren vergleichbar mit den aus Kristallstrukturanalysen gewonnenen Abständen der Lactose-Permease. Es konnten hierdurch erste Hinweise geliefert werden, dass der dem OATP2B1 zugrundeliegende Transportmechanismus einem ähnlichen Prinzip folgt, wie es für den *Rocker-Switch* beschrieben wurde. Die Bindung und der Transport des Substrats an das OATP2B1 führen zu einer Abstandsänderung innerhalb des Moleküls, die sich am ehesten über eine Konformationsänderung erklären ließe.

Diese Arbeit kann insgesamt erste Grundlagen zur weiteren Charakterisierung der Struktur und des Transportmechanismus der OATPs liefern. Sie zeigt, dass die Herstellung eines funktionsfähigen FRET-Fusionsproteins möglich ist und dass deren Untersuchung nachvollziehbare Ergebnisse liefern kann. Außerdem bietet sie einen Ansatz, FRET-basierte Screening-Verfahren für Transportersubstrate zu etablieren. Inwieweit diese praktisch umzusetzen sind, muss jedoch durch aufbauende Arbeiten geklärt werden.

---

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe, Takaaki; Kakyo, Masayuki; Tokui, Taro; Nakagomi, Rie; Nishio, Toshiyuki; Nakai, Daisuke et al. (1999): Identification of a Novel Gene Family Encoding Human Liver-specific Organic Anion Transporter LST-1. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (24), S. 17159–17163. DOI: 10.1074/jbc.274.24.17159.
- Abramson, Jeff; Smirnova, Irina; Kasho, Vladimir; Verner, Gillian; Kaback, H. Ronald; Iwata, So (2003): Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. In: *Science (New York, N.Y.)* 301 (5633), S. 610–615. DOI: 10.1126/science.1088196.
- Agre, Peter (2006): The aquaporin water channels. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 3 (1), S. 5–13. DOI: 10.1513/pats.200510-109JH.
- Akamine, Yumiko; Miura, Masatomo; Sunagawa, Satoko; Kagaya, Hideaki; Yasui-Furukori, Norio; Uno, Tsukasa (2010): Influence of drug-transporter polymorphisms on the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers. In: *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 40 (11), S. 782–789. DOI: 10.3109/00498254.2010.515318.
- Alvarez, Ana I.; Real, Rebeca; Pérez, Miriam; Mendoza, Gracia; Prieto, Julio G.; Merino, Gracia (2010): Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 99 (2), S. 598–617. DOI: 10.1002/jps.21851.
- Amin, Md Lutful (2013): P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. In: *Drug target insights* 7, S. 27–34. DOI: 10.4137/DTI.S12519.
- Annaert, P.; Ye, Z. W.; Stieger, B.; Augustijns, P. (2010): Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. In: *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 40 (3), S. 163–176. DOI: 10.3109/00498250903509375.
- Backman, Janne T.; Luurila, Harri; Neuvonen, Mikko; Neuvonen, Pertti J. (2005): Rifampin markedly decreases and gemfibrozil increases the plasma concentrations of atorvastatin and its metabolites. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 78 (2), S. 154–167. DOI: 10.1016/j.clpt.2005.04.007.
- Berney, Claude; Danuser, Gaudenz (2003): FRET or No FRET. A Quantitative Comparison. In: *Biophysical Journal* 84 (6), S. 3992–4010. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)75126-1.
- Bossuyt, Xavier; Müller, Michael; Meier, Peter J. (1996): Multispecific amphipathic substrate transport by an organic anion transporter of human liver. In: *Journal of Hepatology* 25 (5), S. 733–738. DOI: 10.1016/S0168-8278(96)80246-7.
- Bronger, Holger; König, Jörg; Kopplow, Kathrin; Steiner, Hans-Herbert; Ahmadi, Rezvan; Herold-Mende, Christel et al. (2005): ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. In: *Cancer research* 65 (24), S. 11419–11428. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1271.
- Broussard, Joshua A.; Rappaz, Benjamin; Webb, Donna J.; Brown, Claire M. (2013): Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. In: *Nature Protocols* 8 (2), S. 265–281. DOI: 10.1038/nprot.2012.147.

- 
- Brown, D.; Breton, S. (2000): Sorting proteins to their target membranes. In: *Kidney international* 57 (3), S. 816–824. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00920.x.
- Chang, Abraham B.; Lin, Ron; Keith Studley, W.; Tran, Can V.; Saier, Milton H. (2004): Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. In: *Molecular membrane biology* 21 (3), S. 171–181. DOI: 10.1080/09687680410001720830.
- Craggs, Timothy D. (2009): Green fluorescent protein. Structure, folding and chromophore maturation. In: *Chemical Society reviews* 38 (10), S. 2865–2875. DOI: 10.1039/b903641p.
- Cui, Y.; König, J.; Leier, I.; Buchholz, U.; Keppler, D. (2001): Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (13), S. 9626–9630. DOI: 10.1074/jbc.M004968200.
- Davidson, Amy L.; Dassa, Elie; Orelle, Cedric; Chen, Jue (2008): Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 72 (2), 317–64, table of contents. DOI: 10.1128/MMBR.00031-07.
- European Medicines Agency (2012): Guideline on the investigation of drug interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2, vom 21.06.2012. Online verfügbar unter [http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open\\_document.jsp?webContentId=WC500129606](http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500129606).
- Fojo, A. T.; Ueda, K.; Slamon, D. J.; Poplack, D. G.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. (1987): Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (1), S. 265–269.
- Forster, Samantha; Thumser, Alfred E.; Hood, Steve R.; Plant, Nick (2012): Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in in vitro drug transport assays. In: *PloS one* 7 (3), e33253. DOI: 10.1371/journal.pone.0033253.
- Förster, Th. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Ann. Phys.* 437 (1-2), S. 55–75. DOI: 10.1002/andp.19484370105.
- Fromm, Martin F. (2004): Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. In: *Trends in pharmacological sciences* 25 (8), S. 423–429. DOI: 10.1016/j.tips.2004.06.002.
- Garrigues, Alexia; Nugier, Jérôme; Orlowski, Stéphane; Ezan, Eric (2002): A high-throughput screening microplate test for the interaction of drugs with P-glycoprotein. In: *Analytical biochemistry* 305 (1), S. 106–114. DOI: 10.1006/abio.2002.5650.
- Glaeser, H.; Bailey, D. G.; Dresser, G. K.; Gregor, J. C.; Schwarz, U. I.; McGrath, J. S. et al. (2007): Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 81 (3), S. 362–370. DOI: 10.1038/sj.clpt.6100056.
- Glaeser, H.; Mandery, K.; Sticht, H.; Fromm, M. F.; König, J. (2010): Relevance of conserved lysine and arginine residues in transmembrane helices for the transport activity of organic anion transporting polypeptide 1B3. In: *British journal of pharmacology* 159 (3), S. 698–708. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00568.x.
- Greiner, B.; Eichelbaum, M.; Fritz, P.; Kreichgauer, H. P.; Richter, O. von; Zundler, J.; Kroemer, H. K. (1999): The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (2), S. 147–153. DOI: 10.1172/JCI6663.
- Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Jones, J.; Tsien, R. Y. (2000): Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FAsH. In: *Methods in enzymology* 327, S. 565–578.

- 
- Grube, Markus; Köck, Kathleen; Oswald, Stefan; Draber, Katrin; Meissner, Konrad; Eckel, Lothar et al. (2006): Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 80 (6), S. 607–620. DOI: 10.1016/j.clpt.2006.09.010.
- Grube, Markus; Reuther, Sebastian; Meyer Zu Schwabedissen, Henriette; Köck, Kathleen; Draber, Katrin; Ritter, Christoph A. et al. (2007): Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35 (1), S. 30–35. DOI: 10.1124/dmd.106.011411.
- Gui, Chunshan; Hagenbuch, Bruno (2008): Amino acid residues in transmembrane domain 10 of organic anion transporting polypeptide 1B3 are critical for cholecystikinin octapeptide transport. In: *Biochemistry* 47 (35), S. 9090–9097. DOI: 10.1021/bi8008455.
- Gui, Chunshan; Hagenbuch, Bruno (2009): Role of transmembrane domain 10 for the function of organic anion transporting polypeptide 1B1. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 18 (11), S. 2298–2306. DOI: 10.1002/pro.240.
- Gui, Chunshan; Obaidat, Amanda; Chaguturu, Rathnam; Hagenbuch, Bruno (2010): Development of a cell-based high-throughput assay to screen for inhibitors of organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3. In: *Current chemical genomics* 4, S. 1–8. DOI: 10.2174/1875397301004010001.
- Hagenbuch, B.; Meier, P.J (2003): The superfamily of organic anion transporting polypeptides. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1609 (1), S. 1–18. DOI: 10.1016/S0005-2736(02)00633-8.
- Hagenbuch, Bruno; Meier, Peter J. (2004): Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family. Phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 447 (5), S. 653–665. DOI: 10.1007/s00424-003-1168-y.
- Hänggi, Emanuel; Grundschober, Anne Freimoser; Leuthold, Simone; Meier, Peter J.; St-Pierre, Marie V. (2006): Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. In: *Molecular pharmacology* 70 (3), S. 806–817. DOI: 10.1124/mol.105.019547.
- Hediger, Matthias A.; Romero, Michael F.; Peng, Ji-Bin; Rolfs, Andreas; Takanaga, Hitomi; Bruford, Elspeth A. (2004): The ABCs of solute carriers. Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 447 (5), S. 465–468. DOI: 10.1007/s00424-003-1192-y.
- Higgins, C. F. (1992): ABC transporters. From microorganisms to man. In: *Annual review of cell biology* 8, S. 67–113. DOI: 10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.
- Ho, Richard H.; Tirona, Rommel G.; Leake, Brenda F.; Glaeser, Hartmut; Lee, Woojin; Lemke, Christopher J. et al. (2006): Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. In: *Gastroenterology* 130 (6), S. 1793–1806. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.02.034.

- 
- Hoffmann, Carsten; Gaietta, Guido; Bunemann, Moritz; Adams, Stephen R.; Oberdorff-Maass, Silke; Behr, Bjorn et al. (2005): A FAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. In: *Nature methods* 2 (3), S. 171–176. DOI: 10.1038/NMETH742.
- Hoffmann, Carsten; Gaietta, Guido; Zürn, Alexander; Adams, Stephen R.; Terrillon, Sonia; Ellisman, Mark H. et al. (2010): Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells. In: *Nature Protocols* 5 (10), S. 1666–1677. DOI: 10.1038/nprot.2010.129.
- Hsiang, Bonnie; Zhu, Yingjie; Wang, Zhaoqing; Wu, Yuli; Sasseville, Vito; Yang, Wen-Pin; Kirchgessner, Todd G. (1999): A Novel Human Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP2). In: *The Journal of biological chemistry* 274 (52), S. 37161–37168. DOI: 10.1074/jbc.274.52.37161.
- Huang, Yafei; Lemieux, M. Joanne; Song, Jinmei; Auer, Manfred; Wang, Da-Neng (2003): Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. In: *Science (New York, N.Y.)* 301 (5633), S. 616–620. DOI: 10.1126/science.1087619.
- Hughes, Jeff; Crowe, Andrew (2010): Inhibition of P-glycoprotein–Mediated Efflux of Digoxin and Its Metabolites by Macrolide Antibiotics. In: *J Pharmacol Sci* 113 (4), S. 315–324. DOI: 10.1254/jphs.10109FP.
- Husada, Florence; Gouridis, Giorgos; Vietrov, Ruslan; Schuurman-Wolters, Gea K.; Ploetz, Evelyn; Boer, Marijn de et al. (2015): Watching conformational dynamics of ABC transporters with single-molecule tools. In: *Biochemical Society transactions* 43 (5), S. 1041–1047. DOI: 10.1042/BST20150140.
- Juliano, R. L.; Ling, V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 455 (1), S. 152–162. DOI: 10.1016/0005-2736(76)90160-7.
- Kalliokoski, A.; Niemi, M. (2009): Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. In: *British journal of pharmacology* 158 (3), S. 693–705. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x.
- Kameyama, Yoshio; Yamashita, Keiko; Kobayashi, Kaoru; Hosokawa, Masakiyo; Chiba, Kan (2005): Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1\*5, SLCO1B1\*15 and SLCO1B1\*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. In: *Pharmacogenetics and genomics* 15 (7), S. 513–522.
- Kanai, N.; Lu, R.; Bao, Y.; Wolkoff, A. W.; Vore, M.; Schuster, V. L. (1996): Estradiol 17 beta-D-glucuronide is a high-affinity substrate for oatp organic anion transporter. In: *The American journal of physiology* 270 (2 Pt 2), F326–31. DOI: 10.1152/ajprenal.1996.270.2.F326.
- Kelley, Lawrence A.; Mezulis, Stefans; Yates, Christopher M.; Wass, Mark N.; Sternberg, Michael J. E. (2015): The Pyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. In: *Nature Protocols* 10, 845 EP -. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
- Khrenova, Maria; Topol, Igor; Collins, Jack; Nemukhin, Alexander (2015): Estimating orientation factors in the FRET theory of fluorescent proteins. The TagRFP-KFP pair and beyond. In: *Biophysical Journal* 108 (1), S. 126–132. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.11.1859.
- Klein, P.; Kanehisa, M.; DeLisi, C. (1985): The detection and classification of membrane-spanning proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 815 (3), S. 468–476.
- Kobayashi, Daisuke; Nozawa, Takashi; Imai, Kozue; Nezu, Jun-ichi; Tsuji, Akira; Tamai, Ikumi (2003): Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in

- 
- pH-dependent transport across intestinal apical membrane. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306 (2), S. 703–708. DOI: 10.1124/jpet.103.051300.
- Köck, Kathleen; Koenen, Anna; Giese, Bernd; Fraunholz, Martin; May, Karen; Siegmund, Werner et al. (2010): Rapid modulation of the organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1, SLCO2B1) function by protein kinase C-mediated internalization. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (15), S. 11336–11347. DOI: 10.1074/jbc.M109.056457.
- Koenen, Anna; Köck, Kathleen; Keiser, Markus; Siegmund, Werner; Kroemer, Heyo K.; Grube, Markus (2012): Steroid hormones specifically modify the activity of organic anion transporting polypeptides. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 47 (4), S. 774–780. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.08.017.
- Koenen, Anna; Kroemer, Heyo K.; Grube, Markus; Meyer zu Schwabedissen, Henriette E. (2011): Current understanding of hepatic and intestinal OATP-mediated drug-drug interactions. In: *Expert review of clinical pharmacology* 4 (6), S. 729–742. DOI: 10.1586/ecp.11.58.
- König, J.; Cui, Y.; Nies, A. T.; Keppler, D. (2000a): A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 278 (1), G156–64.
- König, J.; Cui, Y.; Nies, A. T.; Keppler, D. (2000b): Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (30), S. 23161–23168. DOI: 10.1074/jbc.M001448200.
- Kopplow, Kathrin; Letschert, Katrin; König, Jörg; Walter, Bettina; Keppler, Dietrich (2005): Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. In: *Molecular pharmacology* 68 (4), S. 1031–1038. DOI: 10.1124/mol.105.014605.
- Kullak-Ublick, G. A.; Fisch, T.; Oswald, M.; Hagenbuch, B.; Meier, P. J.; Beuers, U.; Paumgartner, G. (1998): Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS): identification of a carrier protein in human liver and brain. In: *FEBS letters* 424 (3), S. 173–176.
- Kullak-Ublick, G. A.; Stieger, B.; Hagenbuch, B.; Meier, P. J. (2000): Hepatic transport of bile salts. In: *Seminars in liver disease* 20 (3), S. 273–292. DOI: 10.1055/s-2000-9426.
- Kullak-Ublick, Gerd A.; Hagenbuch, Bruno; Stieger, Bruno; Schteingart, Claudio D.; Hofmann, Alan F.; Wolkoff, Allan W.; Meier, Peter J. (1995): Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. In: *Gastroenterology* 109 (4), S. 1274–1282. DOI: 10.1016/0016-5085(95)90588-X.
- Kullak-Ublick, Gerd A.; Ismail, Manfred G.; Stieger, Bruno; Landmann, Lukas; Huber, Robert; Pizzagalli, Flavia et al. (2001): Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. In: *Gastroenterology* 120 (2), S. 525–533. DOI: 10.1053/gast.2001.21176.
- Lee, Thomas K.; Koh, Albert S.; Cui, Zhifeng; Pierce, Robert H.; Ballatori, Nazzareno (2003): N-glycosylation controls functional activity of Oatp1, an organic anion transporter. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 285 (2), G371–81. DOI: 10.1152/ajpgi.00358.2002.
- Lee, Woojin; Glaeser, Hartmut; Smith, L. Harris; Roberts, Richard L.; Moeckel, Gilbert W.; Gervasini, Guillermo et al. (2005): Polymorphisms in human organic anion-transporting po-

- 
- lypeptide 1A2 (OATP1A2). Implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (10), S. 9610–9617. DOI: 10.1074/jbc.M411092200.
- Letschert, Katrin; Faulstich, Heinz; Keller, Daniela; Keppler, Dietrich (2006): Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 91 (1), S. 140–149. DOI: 10.1093/toxsci/kfj141.
- Leuthold, Simone; Hagenbuch, Bruno; Mohebbi, Nilufar; Wagner, Carsten A.; Meier, Peter J.; Stieger, Bruno (2009): Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 296 (3), C570-82. DOI: 10.1152/ajpcell.00436.2008.
- Li, L.; Lee, T. K.; Meier, P. J.; Ballatori, N. (1998): Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (26), S. 16184–16191.
- Li, L.; Meier, P. J.; Ballatori, N. (2000): Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. In: *Molecular pharmacology* 58 (2), S. 335–340.
- Lindenbarg, Laurens; Merkx, Maarten (2014): Engineering genetically encoded FRET sensors. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 14 (7), S. 11691–11713. DOI: 10.3390/s140711691.
- Liu, Lichuan; Cui, Yunhai; Chung, Alfred Y.; Shitara, Yoshihisa; Sugiyama, Yuichi; Keppler, Dietrich; Pang, K. Sandy (2006): Vectorial transport of enalapril by Oatp1a1/Mrp2 and OATP1B1 and OATP1B3/MRP2 in rat and human livers. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318 (1), S. 395–402. DOI: 10.1124/jpet.106.103390.
- Maeda, Tomoji; Takahashi, Koichi; Ohtsu, Naoko; Oguma, Toshihiro; Ohnishi, Toshimasa; Atsumi, Ryo; Tamai, Ikumi (2007): Identification of influx transporter for the quinolone antibacterial agent levofloxacin. In: *Molecular pharmaceutics* 4 (1), S. 85–94. DOI: 10.1021/mp060082j.
- Majumdar, Devdoot S.; Smirnova, Irina; Kasho, Vladimir; Nir, Eyal; Kong, Xiangxu; Weiss, Shimon; Kaback, H. Ronald (2007): Single-molecule FRET reveals sugar-induced conformational dynamics in LacY. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (31), S. 12640–12645. DOI: 10.1073/pnas.0700969104.
- Mandery, Kathrin; Sticht, Heinrich; Bujok, Krystyna; Schmidt, Ingrid; Fahrmayr, Christina; Balk, Bettina et al. (2011): Functional and structural relevance of conserved positively charged lysine residues in organic anion transporting polypeptide 1B3. In: *Molecular pharmacology* 80 (3), S. 400–406. DOI: 10.1124/mol.111.071282.
- Markwardt, Michele L.; Kremers, Gert-Jan; Kraft, Catherine A.; Ray, Krishanu; Cranfill, Paula J. C.; Wilson, Corey A. et al. (2011): An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. In: *PloS one* 6 (3), e17896. DOI: 10.1371/journal.pone.0017896.
- Martinez-Becerra, Pablo; Briz, Oscar; Romero, Marta R.; Macias, Rocio I. R.; Perez, Maria J.; Sancho-Mateo, Carlos et al. (2011): Further characterization of the electrogenicity and pH sensitivity of the human organic anion-transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3. In: *Molecular pharmacology* 79 (3), S. 596–607. DOI: 10.1124/mol.110.069971.

- 
- Medintz, Igor; Hildebrandt, Niko (2013): FRET - Förster Resonance Energy Transfer. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Meier-Abt, Fabienne; Mokrab, Younes; Mizuguchi, Kenji (2005): Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily. Identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. In: *The Journal of membrane biology* 208 (3), S. 213–227. DOI: 10.1007/s00232-005-7004-x.
- Meyer zu Schwabedissen, Henriette E.; Tirona, Rommel G.; Yip, Cindy S.; Ho, Richard H.; Kim, Richard B. (2008): Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer. In: *Cancer research* 68 (22), S. 9338–9347. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0265.
- Miyagawa, Mayuko; Maeda, Kazuya; Aoyama, Akinori; Sugiyama, Yuichi (2009): The eighth and ninth transmembrane domains in organic anion transporting polypeptide 1B1 affect the transport kinetics of estrone-3-sulfate and estradiol-17beta-D-glucuronide. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 329 (2), S. 551–557. DOI: 10.1124/jpet.108.148411.
- Müller, Sara M.; Galliardt, Helena; Schneider, Jessica; Barisas, B. George; Seidel, Thorsten (2013): Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells. In: *Frontiers in plant science* 4, S. 413. DOI: 10.3389/fpls.2013.00413.
- Mwinyi, Jessica; John, Andreas; Bauer, Steffen; Roots, Ivar; Gerloff, Thomas (2004): Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 75 (5), S. 415–421. DOI: 10.1016/j.clpt.2003.12.016.
- Nakagomi-Hagihara, Rie; Nakai, Daisuke; Kawai, Kenji; Yoshigae, Yasushi; Tokui, Taro; Abe, Takaaki; Ikeda, Toshihiko (2006): OATP1B1, OATP1B3, and mrp2 are involved in hepatobiliary transport of olmesartan, a novel angiotensin II blocker. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34 (5), S. 862–869. DOI: 10.1124/dmd.105.008888.
- Nayak, Surendra; Batalov, Serge; Jegla, Timothy; Zmasek, Christian (2009): Evolution of the Human Ion Channel Set. In: *CCHTS* 12 (1), S. 2–23. DOI: 10.2174/138620709787047957.
- Nielsen, Claus (2008): Six major steps in animal evolution. Are we derived sponge larvae? In: *Evolution & development* 10 (2), S. 241–257. DOI: 10.1111/j.1525-142X.2008.00231.x.
- Nishizato, Y. (2003): Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes. Consequences for pravastatin pharmacokinetics. In: *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 73 (6), S. 554–565. DOI: 10.1016/S0009-9236(03)00060-2.
- Nozawa, Takashi; Imai, Kozue; Nezu, Jun-ichi; Tsuji, Akira; Tamai, Ikumi (2004): Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 308 (2), S. 438–445. DOI: 10.1124/jpet.103.060194.
- Pedersen, K. E.; Christiansen, B. D.; Klitgaard, N. A.; Nielsen-Kudsk, F. (1983): Effect of quinine on digoxin bioavailability. In: *European journal of clinical pharmacology* 24 (1), S. 41–47.
- Pettersen, Eric F.; Goddard, Thomas D.; Huang, Conrad C.; Couch, Gregory S.; Greenblatt, Daniel M.; Meng, Elaine C.; Ferrin, Thomas E. (2004): UCSF Chimera--a visualization system for



- 
- exploratory research and analysis. In: *Journal of computational chemistry* 25 (13), S. 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
- Petzinger, Ernst; Geyer, Joachim (2006): Drug transporters in pharmacokinetics. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 372 (6), S. 465–475. DOI: 10.1007/s00210-006-0042-9.
- Pohorille, Andrew; Schweighofer, Karl; Wilson, Michael A. (2005): The origin and early evolution of membrane channels. In: *Astrobiology* 5 (1), S. 1–17. DOI: 10.1089/ast.2005.5.1.
- Rees, Douglas C.; Johnson, Eric; Lewinson, Oded (2009): ABC transporters. The power to change. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (3), S. 218–227. DOI: 10.1038/nrm2646.
- Robinson, J. Paul; Darzynkiewicz, Zbigniew; Hoffman, Robert; Nolan, John P.; Rabinovitch, Peter S.; Watkins, Simon (2001): Current Protocols in Cytometry. Detecting Protein–Protein Interactions with CFP-YFP FRET by Acceptor Photobleaching. UNIT 12.7. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Roth, Megan; Obaidat, Amanda; Hagenbuch, Bruno (2012): OATPs, OATs and OCTs. The organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. In: *British journal of pharmacology* 165 (5), S. 1260–1287. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x.
- Sahoo, Harekrushna (2011): Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler. Principle and applications. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 12 (1), S. 20–30. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2011.05.001.
- Saier, Milton H. (2003): Tracing pathways of transport protein evolution. In: *Molecular Microbiology* 48 (5), S. 1145–1156. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03499.x.
- Satlin, Lisa M.; Amin, Vipul; Wolkoff, Allan W. (1997): Organic Anion Transporting Polypeptide Mediates Organic Anion/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Exchange. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (42), S. 26340–26345. DOI: 10.1074/jbc.272.42.26340.
- Su, Yaming; Zhang, Xiaoping; Sinko, Patrick J. (2004): Human Organic Anion-Transporting Polypeptide OATP-A (SLC21A3) Acts in Concert with P-Glycoprotein and Multidrug Resistance Protein 2 in the Vectorial Transport of Saquinavir in Hep G2 Cells. In: *Molecular pharmacology* 1 (1), S. 49–56. DOI: 10.1021/mp0340136.
- Svoboda, Martin; Riha, Juliane; Wlcek, Katrin; Jaeger, Walter; Thalhammer, Theresia (2011): Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs). Regulation of Expression and Function. In: *CDM* 12 (2), S. 139–153. DOI: 10.2174/138920011795016863.
- Szakács, Gergely; Váradi, András; Ozvegy-Laczka, Csilla; Sarkadi, Balázs (2008): The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). In: *Drug discovery today* 13 (9-10), S. 379–393. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.12.010.
- Tamai, I.; Nezu, J.; Uchino, H.; Sai, Y.; Oku, A.; Shimane, M.; Tsuji, A. (2000): Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. In: *Biochemical and biophysical research communications* 273 (1), S. 251–260. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2922.
- Taylor-Wells, Jennina; Meredith, David (2014): The Signature Sequence Region of the Human Drug Transporter Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 Is Important for Protein Surface Expression. In: *Journal of drug delivery* 2014, S. 129849. DOI: 10.1155/2014/129849.

- 
- Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M. M.; Pastan, I.; Willingham, M. C. (1987): Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (21), S. 7735–7738.
- Truong, K.; Ikura, M. (2001): The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. In: *Current opinion in structural biology* 11 (5), S. 573–578.
- U.S. Food and Drug Administration (2012): Guidance for Industry Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling, vom Februar 2012. Online verfügbar unter <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072101.pdf>.
- van der Deure, Wendy M.; Friesema, Edith C. H.; Jong, Frank Jan de; Rijke, Yolanda B. de; Jong, Frank H. de; Uitterlinden, André G. et al. (2008): Organic anion transporter 1B1. An important factor in hepatic thyroid hormone and estrogen transport and metabolism. In: *Endocrinology* 149 (9), S. 4695–4701. DOI: 10.1210/en.2008-0169.
- Vardy, Eyal; Arkin, Isaiah T.; Gottschalk, Kay E.; Kaback, H. Ronald; Schuldiner, Shimon (2004): Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. In: *Protein Science* 13. DOI: 10.1110/ps.04657704.
- Vavricka, Stephan R.; van Montfoort, Jessica; Ha, Huy Riem; Meier, Peter J.; Fattinger, Karin (2002): Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 36 (1), S. 164–172. DOI: 10.1053/jhep.2002.34133.
- Vogel, Steven S.; Thaler, Christopher; Koushik, Srinagesh V. (2006): Fanciful FRET. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2006 (331), re2. DOI: 10.1126/stke.3312006re2.
- Wang, Pijun; Hata, Soichiro; Xiao, Yansen; Murray, John W.; Wolkoff, Allan W. (2008): Topological assessment of oatp1a1: a 12-transmembrane domain integral membrane protein with three N-linked carbohydrate chains. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 294 (4), G1052-9. DOI: 10.1152/ajpgi.00584.2007.
- Wang, Pijun; Wang, Jin J.; Xiao, Yansen; Murray, John W.; Novikoff, Phyllis M.; Angeletti, Ruth Hogue et al. (2005): Interaction with PDZK1 is required for expression of organic anion transporting protein 1A1 on the hepatocyte surface. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (34), S. 30143–30149. DOI: 10.1074/jbc.M503969200.
- Weaver, Yi M.; Hagenbuch, Bruno (2010): Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates. In: *The Journal of membrane biology* 236 (3), S. 279–290. DOI: 10.1007/s00232-010-9300-3.
- Williamson, Beth; Dooley, Kelly E.; Zhang, Yuan; Back, David J.; Owen, Andrew (2013): Induction of influx and efflux transporters and cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes by rifampin, rifabutin, and rifapentine. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57 (12), S. 6366–6369. DOI: 10.1128/AAC.01124-13.
- Xia, Z.; Liu, Y. (2001): Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. In: *Biophysical Journal* 81 (4), S. 2395–2402. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75886-9.

- 
- Yamakawa, Y.; Hamada, A.; Shuto, T.; Yuki, M.; Uchida, T.; Kai, H. et al. (2011): Pharmacokinetic impact of SLCO1A2 polymorphisms on imatinib disposition in patients with chronic myeloid leukemia. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 90 (1), S. 157–163. DOI: 10.1038/clpt.2011.102.
- Yamashiro, Wakaba; Maeda, Kazuya; Hirouchi, Masakazu; Adachi, Yasuhisa; Hu, Zhuohan; Sugiyama, Yuichi (2006): Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34 (7), S. 1247–1254. DOI: 10.1124/dmd.105.008938.
- Yasui-Furukori, Norio; Uno, Tsukasa; Sugawara, Kazunobu; Tateishi, Tomonori (2005): Different effects of three transporting inhibitors, verapamil, cimetidine, and probenecid, on fexofenadine pharmacokinetics. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 77 (1), S. 17–23. DOI: 10.1016/j.clpt.2004.08.026.
- You, Guofeng; Morris, Marilyn Emily (Hg.) (2007): Drug transporters. Molecular characterization and role in drug disposition. ebrary, Inc. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience (Wiley Series in Drug Discovery and Development, v.4). Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10296224>.
- Zarrabi, Nawid; Ernst, Stefan; Verhalen, Brandy; Wilkens, Stephan; Börsch, Michael (2014): Analyzing conformational dynamics of single P-glycoprotein transporters by Förster resonance energy transfer using hidden Markov models. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 66 (2), S. 168–179. DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.07.026.
- Zheng, H. X.; Huang, Y.; Frassetto, L. A.; Benet, L. Z. (2009): Elucidating rifampin's inducing and inhibiting effects on glyburide pharmacokinetics and blood glucose in healthy volunteers. Unmasking the differential effects of enzyme induction and transporter inhibition for a drug and its primary metabolite. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 85 (1), S. 78–85. DOI: 10.1038/clpt.2008.186.
- Zheng, Jian; Chan, Ting; Cheung, Florence Shin Gee; Zhu, Ling; Murray, Michael; Zhou, Fanfan (2014): PDZK1 and NHERF1 regulate the function of human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) by modulating its subcellular trafficking and stability. In: *PloS one* 9 (4), e94712. DOI: 10.1371/journal.pone.0094712.

Molecular graphics and analyses were performed with the UCSF Chimera package. Chimera is developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIGMS P41-GM103311)

## Anhang

### Material

#### Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät oder Material	Firma
Aluminium-Folie Rotilabo®, 30 µm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Analysenwaage M-pact AX142	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Argon-Ionen-Lasereinheit (LSM 780) LASOS LGN 3001 / Zeiss AIM-SYSTEM 2504000156	LASOS Lasertechnik GmbH, Jena, Deutschland
Automatisches digital Refraktometer RX-5000α-Plus	Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan
Bad-Umwälzthermostat ED-5A	JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
Biologische Sicherheitswerkbank (Klasse II) Herasafe™ KS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Blotting-Kammer Mini-Protean® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Cellulose-Chromatographiepapier Whatman™ Grade 3MM	General Electric Company, Boston, USA
CO <sub>2</sub> -Brutschrank INCO 246	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator Midi 40	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Eisbehälter Magic Touch™	Bel-Art SP Scienceware, Wayne, USA
Elektrophoresekammern EasyPhor Midi, Medi, Maxi	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Elektrophorese-Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Flocken-Eisbereiter RF 0399 A	Manitowoc Ice, Inc., Manitowoc, USA

Gerät oder Material	Firma
Gaskartusche Typ 1430	Carl Friedrich Usbeck KG, Radevormwald, Deutschland
Gefrierbehälter Nalgene® Cryo 1°C	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Geldokumentationssystem Gel Logic 200 Imaging System	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Geldokumentationssystem ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Handschuhe Peha-soft® nitrile fino	Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Heizblock DB49920	Barnstead/Thermolyne, Dubuque, USA
Immersionsöl Immersol 518 F	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutsch- land
Inkubationshaube TH 15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutsch- land
Inverses Mikroskop Observer.Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutsch- land
Kammerdeckgläser (#1.0 Borosilkat) Nunc™ Lab-Tek™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kartuschenbrenner Typ 1420	Carl Friedrich Usbeck KG, Radevormwald, Deutschland
Kompaktschüttler KS 15 control	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutsch- land
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 780	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutsch- land
Konische Zentrifugenröhrchen Falcon® (15 mL, 50 mL)	Corning Inc., Corning, USA
Kreisschüttler Standard 3500 VWR Collection	VWR International, LLC., Radnor, USA
Kryoröhrchen Cryo.s™ 2 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mehrkanalpipette Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Gerät oder Material	Firma
Mikrotiterplatte Nunc™ MicroWell™ 96-well, Flachboden	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mikrowelle MWG 775 H	Clatronic International GmbH, Kempen, Deutschland
Mikrozentrifuge Mini Star silverline	VWR International, LLC., Radnor, USA
Mikrozentrifuge Heraeus™ Pico 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Nitrocellulosemembran Amersham Protran 0,2 NC	General Electric Company, Boston, USA
PAGE-Kammer Minigel-Twin	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäß PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 mL	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
pH-Messgerät FiveEasy™	Mettler-Toledo International Inc., Columbus, USA
Pipetten Reference®, Research Plus® variabel	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze ratiolab® 1000 µL, blau	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Pipettenspitze 200 µL, transparent	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht, Deutschland
Pipettenspitze VWR® 10 µL, transparent	VWR International, LLC., Radnor, USA
Pipettierhilfe Pipetboy Acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Plattenlesegerät Infinite® M200	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Präzisionstücher Kimtech® Science	Kimberly-Clark Corporation, Dallas, USA
Präzisionswaage Explorer®	Ohaus Corporation, Pasippany, USA
Präzisionswaage M-pact AX623	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Gerät oder Material	Firma
Quecksilber-Beleuchtungseinrichtung HXP 120 C	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Reagenzglasschüttler Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Reagenzglasschüttler Reax control	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Reagenzglasschüttler VWR Collection	VWR International, LLC., Radnor, USA
Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reinstwassersystem Astacus	membraPure GmbH, Berlin, Germany
Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25, 50 mL	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht, Deutschland
Spektralphotometer NanoDrop™ 1000	VWR International, LLC., Radnor, USA
Stickstofflagereinrichtung MVE TEC 3000	Chart Ferox, Inc., Děčín, Tschechien
Szintillationszähler (β-Counter) Wallac 1409	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA
Szintillationszählröhrchen Micro 4 mL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Temperierter Magnetrührer Variomag Maxi Direct	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Temperierter Schüttler ThermoCell MixingBlock MB-102	Bioer Technology, Hangzhou, China
Thermocycler T100™	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Tiefkühlschrank (-80 °C) KLS 7086-5	Kryotec-Kryosafe GmbH, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima™ MAX-XP	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Wärmeschrank WTC	Fa. BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Gerät oder Material	Firma
Wasserbad Aqualine AL 25	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellkulturflaschen Falcon® 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , TC behandelt	Corning Inc., Corning, USA
Zellkulturplatten Falcon® 6-, 24-, 96-well, TC behandelt	Corning Inc., Corning, USA
Zellkulturschale Falcon® 150 mm, TC behandelt	Corning Inc., Corning, USA
Zellzählgerät Casy® Model TT	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bre- men, Deutschland

### Chemikalien und kommerzielle Kits

Chemikalie	Firma
[3H]-Atorvastatin 10 Ci/mmol; 1 mCi/mL	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
[3H]-Estron-3-sulfat 50 Ci/mmol; 1 mCi/mL	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
17β-Estradiol-3-glucuronid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2,3-Dimercapto-1-propanol	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Agar	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin, Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aprotinin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau, Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CASYton	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bre- men, Deutschland
D(+)-Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland



Chemikalie	Firma
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ddH <sub>2</sub> O	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
DMEM Zellkulturmedium	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DPBS (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
EDTA, Natriumsalz, Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Estron-3-sulfat, Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FastDigest Green Buffer (10×)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Geneticin (als Paneticin G418)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
H <sub>2</sub> O	gewonnen über Umkehrosmose durch Reinstwassersystem Astacus
HCl, 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Lipofectamin 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Chemikalie	Firma
Magermilchpulver	Krüger GmbH & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
MEM Nicht essentielle Aminosäuren	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Methanol	Avantor Performance Materials, LLC, Center Valley, USA
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi Plus	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
peqGOLD 1 kb DNA Ladder	VWR International, LLC., Radnor, USA
peqGOLD 100 bp DNA Ladder	VWR International, LLC., Radnor, USA
PfuUltra HF Puffer (10×)	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PMSF	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rifampicin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiszint® eco plus	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS, Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
T4 DNA Ligase Puffer (10×)	Promega Corporation, Madison, USA

Chemikalie	Firma
TC-FIAsh™ II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kit (Green Fluorescence), for live-cell imaging	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TEMED	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trypton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### Gebrauchsfertige Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Agarose-Lösung	TBE	
	Agarose	0,8; 1; 2 %
	Ethidiumbromid	1,7 µM
Blockierlösung	TBST	
	Magermilchpulver	10 %
Einfriermedium	FCS	
	DMSO	10 %
Inkubationspuffer	H <sub>2</sub> O	
	NaCl	142 mM
	KCl	5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,5 mM
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,2 mM
	D(+)-Glucose	5,0 mM
	HEPES	12,5 mM
	NaOH	pH-Wert 7,3
Kulturagar für E. coli	LB-Medium	
	Agar	4,5 %

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Kulturmedium für HeLa- und MDCKII-Zellen	DMEM	
	Glucose	25 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	44 mM
	FCS	10 %
	L-Glutamin	2 mM
	NEAA	2 mM
Lämmli-Puffer (4×)	H <sub>2</sub> O	
	TRIS	0,25 M
	SDS, Na <sup>+</sup> -Salz	277,4 mM
	Glycerol 100 %	4,34 M
	Bromphenolblau, Na <sup>+</sup> -Salz	0,58 mM
	β-Mercaptoethanol	2,56 M
LB-Medium für E. coli	H <sub>2</sub> O	
	Trypton	1 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	171,12 mM
Lyse-Puffer	H <sub>2</sub> O	
	SDS, Na <sup>+</sup> -Salz	6,9 mM
	EDTA, 2Na <sup>+</sup> -Salz, Dihydrat	5 mM
Saccharose-Stopper (10×)	H <sub>2</sub> O	
	EDTA, 2Na <sup>+</sup> -Salz, Dihydrat	80 mM
	D(+)-Saccharose	0,7 M
	Bromphenolblau, Na <sup>+</sup> -Salz	3,6 mM
Sammelgelpuffer	H <sub>2</sub> O	
	TRIS	643,9 mM
	HCl	pH-Wert 6,8
Stripping-Puffer	H <sub>2</sub> O	
	TRIS	62,49 mM
	SDS, Na <sup>+</sup> -Salz	69,35 mM
	β-Mercaptoethanol	89,6 mM
	HCl	pH-Wert 6,8
Tankpuffer	H <sub>2</sub> O	
	TRIS	24,76 mM
	Glycin	190,5 mM
	SDS, Na <sup>+</sup> -Salz	3,47 mM

Bezeichnung	Zusammensetzung	
TBE	H <sub>2</sub> O	
	TRIS	100 mM
	EDTA, 2Na <sup>+</sup> -Salz, Dihydrat	2 mM
	Borsäure	64,4 mM
TBS	H <sub>2</sub> O	
	NaCl	1,37 M
	KCl	26,8 mM
	TRIS	247,64 mM
	HCl	pH-Wert 7,4
TBST	TBS	
	Tween 20	0,04 %
Towbin (1×)	H <sub>2</sub> O	
	Towbin (10×)	10 %
	Methanol	20 %
Towbin (10×)	H <sub>2</sub> O	
	TRIS	25 mM
	Glycin	191,2 mM
Trenngelpuffer	H <sub>2</sub> O	
	TRIS	1,4 M
	NaOH	pH-Wert 8,8

## Enzyme

Bezeichnung	Firma
FastDigest BssHII /PteI <b>G/CGCGC</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FastDigest DpnI <b>GmA/TC</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FastDigest HindIII <b>A/AGCTT</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FastDigest NotI <b>GC/GGCGCC</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FastDigest PacI <b>TAAT/TAA</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FastDigest PstI <b>CTGCA/G</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Bezeichnung	Firma
FastDigest XhoI <b>C/TCGAG</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PfuUltra Hotstart	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
T4 DNA Ligase	Promega Corporation, Madison, USA

## Plasmidvektoren

Bezeichnung	Firma
ECFP-EYFP-FRET-Positivkontrolle	Freissmuth et al., Institut für Pharmakologie, Universität Wien
pcDNA™3.1/Hygro <sup>(-)</sup>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
pECFP-C1	Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan
pECFP-N1	Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan
pEYFP-C1	Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan
pEYFP-N1	Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan
pJet1.2/blunt	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

## Oligonukleotide

Verwendete Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Synthese erfolgte mittels Phosphoramiditmethode. Die Lieferung erfolgte als Lyophilisat zu je 0,01 µmol, gereinigt durch die firmeneigene High Purity Salt Free Aufreinigung und kontrolliert durch MALDI-TOF Massenspektroskopie. Fett gedruckte, kursive **Basen** stellen die durch den Primer ausgetauschten Basen bei einer Mutagenese-PCR dar. Kursive *Basen* stellen jene dar, die im Vergleich zur nativen Sequenz in einer vorherigen Mutagenese bereits ausgetauscht wurden. Grau hinterlegte **Basen** codieren das Tetracystein-Motiv. Basenfolgen ohne Markierungen stellen Sequenzierungsprimer dar.

Bezeichnung	Basenfolge (5' → 3')
2B1-BssHII-S1-F	GTTTGTGAGCTATTTTGGCAGT <b>GCGCGC</b> CACCGACCCCGAATG
2B1-BssHII-S1-R	CATTCGGGGTCGGTG <b>GCGCGC</b> ACTGCCAAAATAGCTCACAAAC
2B1-BssHII-S2-F	CATCGATGACTTTGCCAC <b>GCGCGC</b> AACTCGCCCCTCTACCTCG
2B1-BssHII-S2-R	CGAGGTAGAGGGGCGAGTT <b>GCGCGC</b> GTGGGCAAAGTCATCGATG
2B1-BssHII-S5-F	CATGCTCATCCTAAGAGGAG <b>GCGCGC</b> AAAGAAGACAAGACTTTGG
2B1-BssHII-S5-R	CCAAAGTCTTGTCTTCTTT <b>GCGCGC</b> TCTCTTAGGATGAGCATG

Bezeichnung	Basenfolge (5' → 3')
2B1-FIAsH-nmPG-F	CCTCTAAG <b>TGTTG</b> TCTGGGTGTTGTACGAAGAAGCAGGATGGC
2B1-FIAsH-nmPG-R	GCCATCCTGCTTCTTCGTACAACACCCAGG <b>ACAACA</b> CTTAGAGG
2B1-FIAsH-nPG-F	CCTCTAAGCAGAGCCCTGGG <b>TGTTGT</b> ACGAAGAAGCAGGATGGC
2B1-FIAsH-nPG-R	GCCATCCTGCTTCTTCGT <b>ACAACA</b> CCCGGGCTCTGCTTAGAGG
2B1-HindIII-R	AGACA <b>AAGCTT</b> CACTCGGGAATCCTCTGGCTTCTTCCCTGG
2B1-XhoI-F	TCCA <b>CTCGAGATG</b> GGACCCAGGATAGGGCCAGCGGGTGAG
ECFP-Mitte-F	GCATCGACTTCAAGGAGGACG
ECFP-Mitte-R	CGTCCTCCTTGAAGTCGATGC
exS2-FIAsH-F	CAAGGCTTCCCTGTGCT <b>TGTCCC</b> GGATGCT <b>GT</b> GCCCCAGCCTCGGC
exS2-FIAsH-R	GCCGAGGCTGGGGC <b>ACAGCATCC</b> GGG <b>ACAG</b> CACAGGGAAGCCTTG
exS2-FIAsH-R	CTGGACCACCCAGCT <b>GCAGCAGCCTGGC</b> AGCAGGGTGTGATGTA
exS5-FIAsH-F	TACATCACACCCTGCT <b>TGCC</b> CAGGCTGCT <b>GC</b> AGCTGGGTGGTCCAG
extrazS2-Ptel-F	TCAAGGCTTCCCTGTGCG <b>CGCGC</b> ACAACCTCGGCCCCAGC
extrazS2-Ptel-R	GCTGGGGCCGAGGTTGT <b>CGCGCGC</b> CACAGGGAAGCCTTGA
extrazS5-Ptel-F	CTCGTGTGGAATACATC <b>CGCGCGCT</b> GCCACGCAGGCTGCTC
extrazS5-Ptel-R	GAGCAGCCTGCGTGGCAG <b>CGCGCGC</b> GATGTATTCCACACGAG
FIAsH-Nterm-F	<b>AGCTTATG</b> TTTCTGAACTGTTGTCCTGGTTGTTGTATGGAACCG <b>CTGCA</b>
FIAsH-Nterm-R	<b>GCGGTTCCATACAACA</b> ACCAGGACAACAGTTCAGAAACATA
FIAsH-positiv-F	<b>AGCTTATG</b> TTTCTGAACTGTTGTCCTGGTTGTTGTATGGAACCGTAAG <b>C</b>
FIAsH-positiv-R	<b>GGCCGCTTACGGTTCATACAACA</b> ACCAGGACAACAGTTCAGAAACATA
OATP2B1-Seq1-F	<b>ATG</b> GGACCCAGGATAGGGCC
OATP2B1-Seq2-F	CCAGCATCTGAGTGTGGTGG
OATP2B1-Seq3-F	CATTAAAGTCTTCCCCAGGG
OATP2B1-Seq4-F	CCGTGCTGGCAGGATCCTGC
OATP2B1-Seq5-F	CGTAGAGCAGCAATTGCTAG
PacI-2B1-Mut-F	CCTGACTGTGATCCAG <b>TTAATTAA</b> AGTCTTCCCCAGGG
PacI-2B1-Mut-R	CCCTGGGGAAGACT <b>TTAATTAA</b> CTGGATCACAGTCAGG
pECFP-Seq-post-MCS-R	TTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAA
pECFP-Seq-präMCS-F	AGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGA
S2-FIAsH-F	CCTACATCGATGACT <b>GTTGCC</b> CCGGCTGCTGCTCGCCCCTCTACC
S2-FIAsH-pr-F	CATCGATGACTTTGCCAC <b>GGCTGCTG</b> CTCGCCCCTCTACCTCG

Bezeichnung	Basenfolge (5' → 3')
S2-FIAsH-pr-R	CGAGGTAGAGGGGCGAG <b>CAGCAGCC</b> GTGGGCAAAGTCATCGATG
S2-FIAsH-R	GGTAGAGGGGCGAGCAGCAGCC <b>GGGCAAC</b> AGTCATCGATGTAGG
S4-FIAsH-F	CGTCCTGGTCAAG <b>TGTTGCCCCGGGTGCTGT</b> GTGGGATGCGGTGC
S4-FIAsH-pr-F	GGTGGCGTCCTGGTCAAG <b>TGTTGCC</b> CCCTGGGCCCTGTGGGATGC
S4-FIAsH-pr-R	GCATCCACAGGGCCCAGG <b>GGGCAAC</b> ACTTGACCAGGACGCCACC
S4-FIAsH-R	GCACCGCATCCACAC <b>CAGCACCC</b> GGGGCAACA <b>CA</b> CTTGACCAGGACG
S5-FIAsH-F	GCTCATCCTAAGAT <b>TGTTGTCCGGATGTTG</b> CAAGACTTTGGCTG
S5-FIAsH-pr-F	CATGCTCATCCTAAGAT <b>TGTTGTCC</b> GAAAGAAGACAAGACTTTGG
S5-FIAsH-pr-R	CCAAAGTCTTGCTTTCTTTC <b>GGACAAC</b> ATCTTAGGATGAGCATG
S5-FIAsH-R	CAGCCAAAGTCTTG <b>CAACATCCC</b> GGACAACATCTTAGGATGAGC
YFP-BssHII-F	GGTC <b>GCGCGCATG</b> GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACC
YFP-BssHII-R	GGCC <b>GCGCGC</b> CTTGACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGAT
YFP-Pac-neu-F	ACCG <b>TTAATTAACATG</b> GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGG
YFP-Pac-neu-R	GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG <b>TTAATTAAC</b> CGC

## Antikörper

Bezeichnung	Herkunft
Anti-Kaninchen-IgG-, HRP-konjugiert	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
GAPDH, Maus	Biodesign International Inc., Saco, USA
OATP2B1, Kaninchen	intern produziert (Grube et al. 2007)

## Zelllinien und Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft
HeLa	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
MDCKII	ATCC, Manassas, USA
SoloPack® Gold Supercompetent Cells	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA

## Software

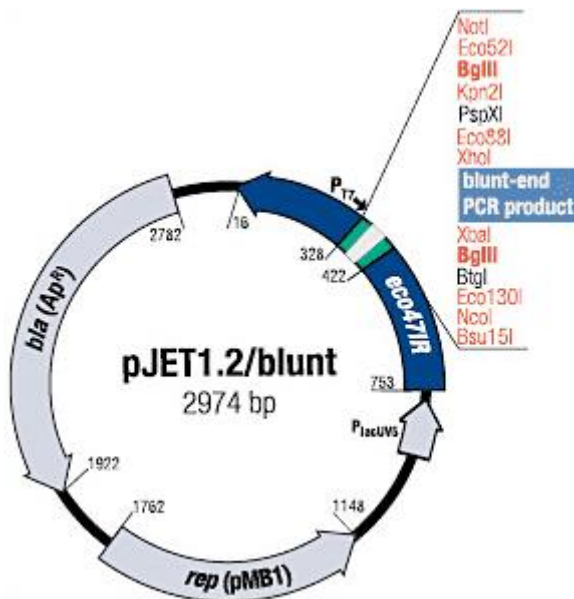
Bezeichnung	Firma
1-D Analyseprogramm (ChemiDoc™) Quantity One 4.6.9	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA



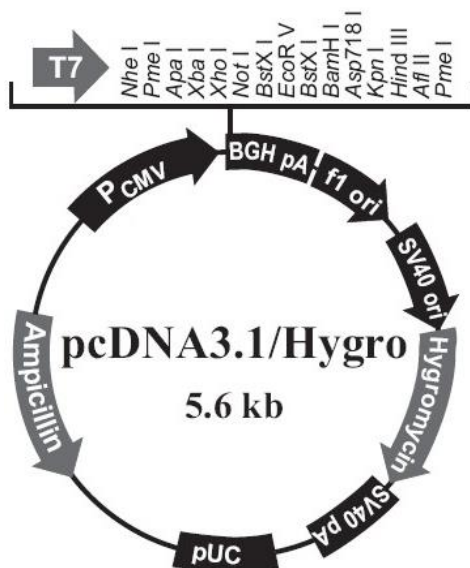
Bezeichnung	Firma
Betriebssoftware LSM 780 ZEN 2010 Imaging Software	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Betriebssoftware NanoDrop™ 1000 NanoDrop 1000, Version 3.8.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Betriebssoftware Observer.Z1 PALMRobo V4.5	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Bildgebungsprogramm (Gel Logic 200) Molecular Imaging Software 4.5.1	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Bioinformatikprogramm Clone Manager Professional Suite Version 8	Scientific & Educational Software, Denver, USA
Molekulares Modellierungsprogramm UCSF Chimera 1.10.1	Resource for Biocomputing, Visualization, and In- formatics at the University of California, San Francisco, USA
Statistikprogramm GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Textbearbeitungsprogramm Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Vektor-Grafikprogramm Inkscape 0.92.1	Freie Software (GPL), Inkscape Community, mul- tinalational

## Vektorkarten

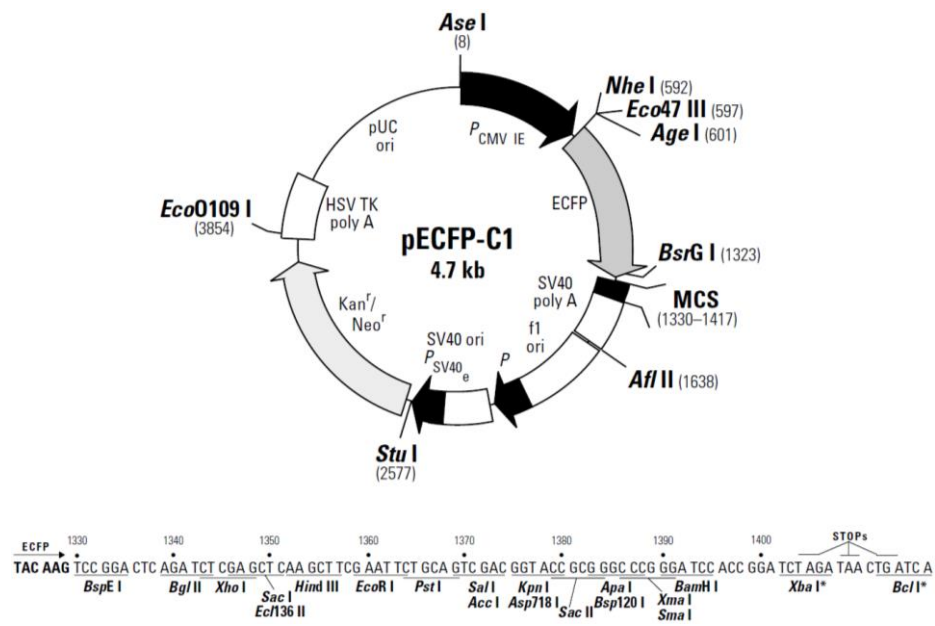
### pJET1.2/blunt



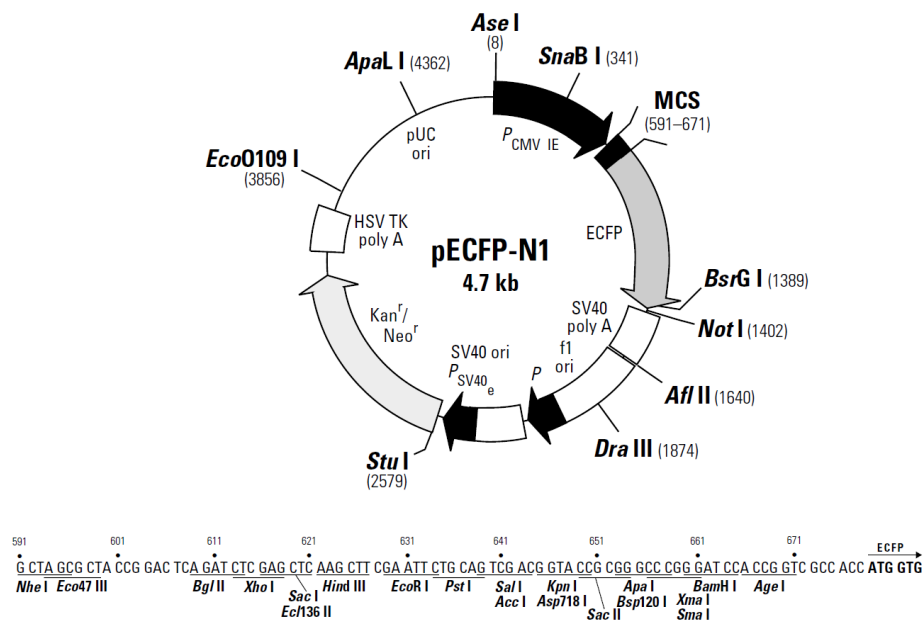
### pcDNA™3.1/Hygro<sup>(-)</sup>



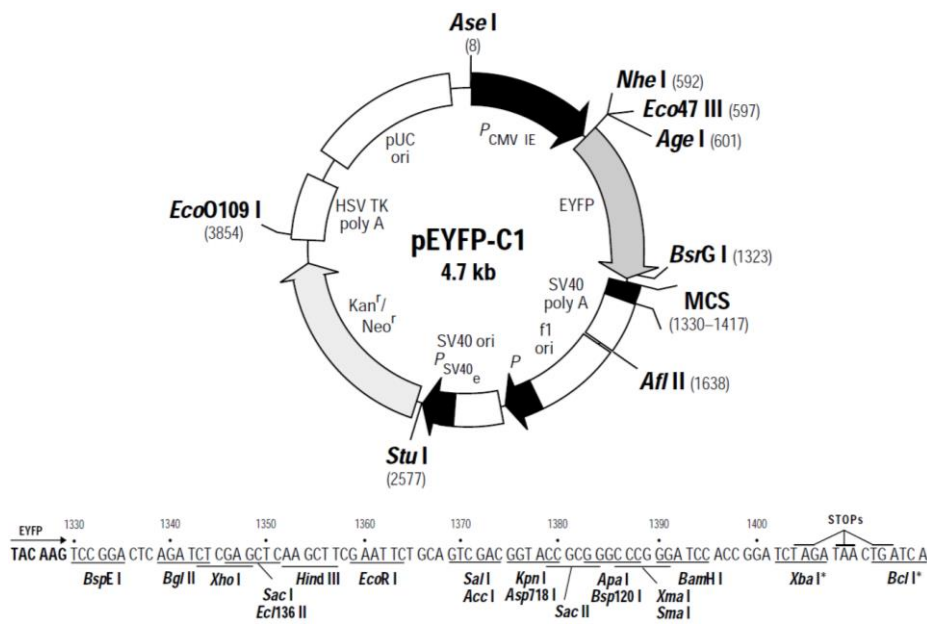
## pECFP-C1



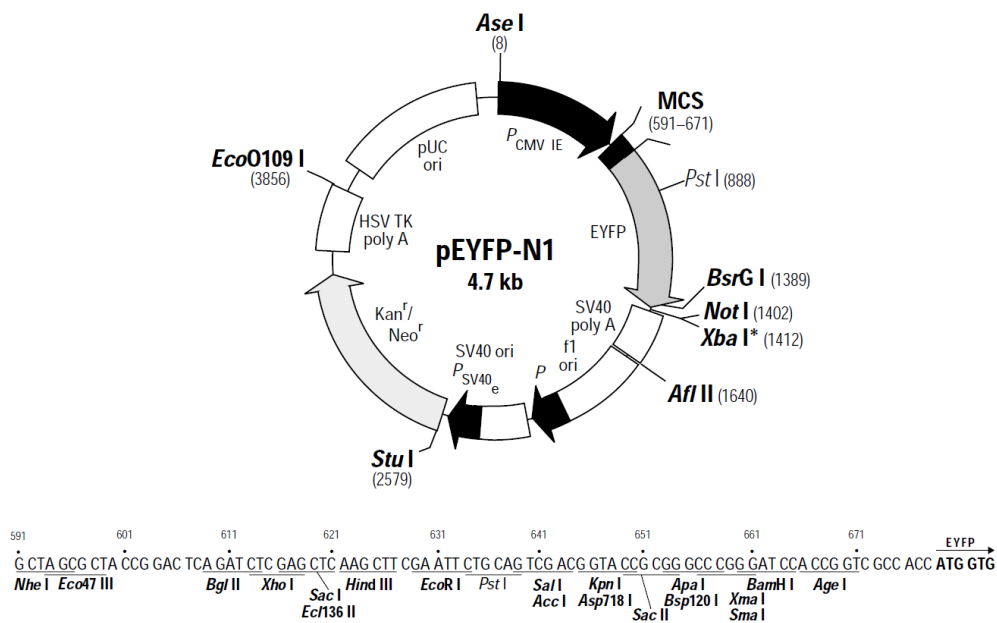
## pECFP-N1



## pEYFP-C1



## pEYFP-N1



## Sequenzierungen

### OATP2B1-ECFP

(OATP2B1: NM\_007256.4; ECFP: LT726795.1)

		OATP2B1-Seq1-F																	
		M G P R I G P A G E V P Q V P																	
Query	1	GACTCAGATCTCGAGATGGGACCCAGGATAGGGCCAGCGGGTGAGGTACCCAGGTACCA																60	
Sbjct	1	GACTCAGATCTCGAGATGGGACCCAGGATAGGGCCAGCGGGTGAGGTACCCAGGTACCA																60	
		M G P R I G P A G E V P Q V P																	
		D K E T K A T M G T E N T P G G K A S P																	
Query	61	GACAAGGAAACCAAAGCCACAATGGGCACAGAAAACACACCTGGAGGCAAAGCCAGCCCA																120	
Sbjct	61	GACAAGGAAACCAAAGCCACAATGGGCACAGAAAACACACCTGGAGGCAAAGCCAGCCCA																120	
		D K E T K A T M G T E N T P G G K A S P																	
		D P Q D V R P S V F H N I K L F V L C H																	
Query	121	GACCCTCAGGACGTGCGGCCAAGTGTGTTCCATAACATCAAGCTGTTCTGTGCCAC																180	
Sbjct	121	GACCCTCAGGACGTGCGGCCAAGTGTGTTCCATAACATCAAGCTGTTCTGTGCCAC																180	
		D P Q D V R P S V F H N I K L F V L C H																	
		S L L Q L A Q L M I S G Y L K S S I S T																	
Query	181	AGCCTGCTGCAGCTGGCGCAGCTCATGATCTCCGGCTACCTAAAGAGCTCCATCTCCACA																240	
Sbjct	181	AGCCTGCTGCAGCTGGCGCAGCTCATGATCTCCGGCTACCTAAAGAGCTCCATCTCCACA																240	
		S L L Q L A Q L M I S G Y L K S S I S T																	
		V E K R F G L S S Q T S G L L A S F N E																	
Query	241	GTGGAGAAGCGCTTCGGCCTCTCCAGCCAGACGTCGGGGCTGCTGGCCTCCTTCAACGAG																300	
Sbjct	241	GTGGAGAAGCGCTTCGGCCTCTCCAGCCAGACGTCGGGGCTGCTGGCCTCCTTCAACGAG																300	
		V E K R F G L S S Q T S G L L A S F N E																	
		V G N T A L I V F V S Y F G S R V H R P																	
Query	301	GTGGGGAACACAGCCTTGATTGTGTTTGTGAGCTATTTTGGCAGCCGGGTGCACCGACCC																360	
Sbjct	301	GTGGGGAACACAGCCTTGATTGTGTTTGTGAGCTATTTTGGCAGCCGGGTGCACCGACCC																360	
		V G N T A L I V F V S Y F G S R V H R P																	

```

      R M I G Y G A I L V A L A G L L M T L P
Query  361  CGAATGATTGGCTATGGGGCTATCCTTGTGGCCCTGGCGGGCCTGCTCATGACTCTCCCG  420
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   361  CGAATGATTGGCTATGGGGCTATCCTTGTGGCCCTGGCGGGCCTGCTCATGACTCTCCCG  420
      R M I G Y G A I L V A L A G L L M T L P

      H F I S E P Y R Y D N T S P E D M P Q D
Query  421  CACTTCATCTCGGAGCCATAACCGCTACGACAACACCAGCCCTGAGGATATGCCACAGGAC  480
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   421  CACTTCATCTCGGAGCCATAACCGCTACGACAACACCAGCCCTGAGGATATGCCACAGGAC  480
      H F I S E P Y R Y D N T S P E D M P Q D

      F K A S L C L P T T S A P A S A P S N G
Query  481  TTCAAGGCTTCCTGTGCCTGCCACAACCTCGGCCCCAGCCTCGGCCCCCTCCAATGGC  540
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   481  TTCAAGGCTTCCTGTGCCTGCCACAACCTCGGCCCCAGCCTCGGCCCCCTCCAATGGC  540
      F K A S L C L P T T S A P A S A P S N G
      OATP2B1-Seq2-F
      N C S S Y T E T Q H L S V V G I M F V A
Query  541  AACTGCTCAAGCTACACAGAAACCCAGCATCTGAGTGTGGTGGGATCATGTTCGTGGCA  600
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   541  AACTGCTCAAGCTACACAGAAACCCAGCATCTGAGTGTGGTGGGATCATGTTCGTGGCA  600
      N C S S Y T E T Q H L S V V G I M F V A

      Q T L L G V G G V P I Q P F G I S Y I D
Query  601  CAGACCCTGCTGGGCGTGGGCGGGGTGCCATTACAGCCCTTTGGCATCTCCTACATCGAT  660
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   601  CAGACCCTGCTGGGCGTGGGCGGGGTGCCATTACAGCCCTTTGGCATCTCCTACATCGAT  660
      Q T L L G V G G V P I Q P F G I S Y I D

      D F A H N S N S P L Y L G I L F A V T M
Query  661  GACTTTGCCCACAACAGCAACTCGCCCCTCTACCTCGGGATCCTGTTTGCAGTGACCATG  720
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   661  GACTTTGCCCACAACAGCAACTCGCCCCTCTACCTCGGGATCCTGTTTGCAGTGACCATG  720
      D F A H N S N S P L Y L G I L F A V T M

      M G P G L A F G L G S L M L R L Y V D I
Query  721  ATGGGGCCAGGCCTGGCCTTTGGGCTGGGCAGCCTCATGCTGCGCCTTTATGTGGACATT  780
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   721  ATGGGGCCAGGCCTGGCCTTTGGGCTGGGCAGCCTCATGCTGCGCCTTTATGTGGACATT  780
      M G P G L A F G L G S L M L R L Y V D I
```

```

      N Q M P E G G I S L T I K D P R W V G A
Query  781  AACCAGATGCCAGAAGGTGGTATCAGCCTGACCATAAAGGACCCCGATGGGTGGGTGCC 840
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   781  AACCAGATGCCAGAAGGTGGTATCAGCCTGACCATAAAGGACCCCGATGGGTGGGTGCC 840
      N Q M P E G G I S L T I K D P R W V G A

      W W L G F L I A A G A V A L A A I P Y F
Query  841  TGGTGGCTGGGTTTCCTCATCGCTGCCGGTGCAGTGGCCCTGGCTGCCATCCCCTACTTC 900
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   841  TGGTGGCTGGGTTTCCTCATCGCTGCCGGTGCAGTGGCCCTGGCTGCCATCCCCTACTTC 900
      W W L G F L I A A G A V A L A A I P Y F

      F F P K E M P K E K R E L Q F R R K V L
Query  901  TTCTTCCCAAGGAAATGCCAAGGAAAAACGTGAGCTTCAGTTTCGGCGAAAGGTCTTA 960
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   901  TTCTTCCCAAGGAAATGCCAAGGAAAAACGTGAGCTTCAGTTTCGGCGAAAGGTCTTA 960
      F F P K E M P K E K R E L Q F R R K V L

      A V T D S P A R K G K D S P S K Q S P G
Query  961  GCAGTCACAGACTCACCTGCCAGGAAGGGCAAGGACTCTCCCTCTAAGCAGAGCCCTGGG 1020
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   961  GCAGTCACAGACTCACCTGCCAGGAAGGGCAAGGACTCTCCCTCTAAGCAGAGCCCTGGG 1020
      A V T D S P A R K G K D S P S K Q S P G

      E S T K K Q D G L V Q I A P N L T V I Q
Query  1021 GAGTCCACGAAGAAGCAGGATGGCCTAGTCCAGATTGCACCAAACCTGACTGTGATCCAG 1080
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   1021 GAGTCCACGAAGAAGCAGGATGGCCTAGTCCAGATTGCACCAAACCTGACTGTGATCCAG 1080
      E S T K K Q D G L V Q I A P N L T V I Q
OATP2B1-Seq3-F
      F I K V F P R V L L Q T L R H P I F L L
Query  1081 TTCATTAAAGTCTTCCCCAGGGTGCTGCTGCAGACCCTACGCCACCCCATCTTCCTGCTG 1140
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   1081 TTCATTAAAGTCTTCCCCAGGGTGCTGCTGCAGACCCTACGCCACCCCATCTTCCTGCTG 1140
      F I K V F P R V L L Q T L R H P I F L L

      V V L S Q V C L S S M A A G M A T F L P
Query  1141 GTGGTCCTGTCCCAGGTATGCTTGTCATCCATGGCTGCGGGCATGGCCACCTTCCTGCCC 1200
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   1141 GTGGTCCTGTCCCAGGTATGCTTGTCATCCATGGCTGCGGGCATGGCCACCTTCCTGCCC 1200
      V V L S Q V C L S S M A A G M A T F L P

```

		K F L E R Q F S I T A S Y A N L L I G C	
Query	1201	AAGTTCCTGGAGCGCCAGTTTTCATCACAGCCTCCTACGCCAACCTGCTCATCGGCTGC	1260
Sbjct	1201	AAGTTCCTGGAGCGCCAGTTTTCATCACAGCCTCCTACGCCAACCTGCTCATCGGCTGC	1260
		K F L E R Q F S I T A S Y A N L L I G C	
		L S F P S V I V G I V V G G V L V K R L	
Query	1261	CTCTCCTTCCCTTCGGTCATCGTGGGCATCGTGGTGGGTGGCGTCCTGGTCAAGCGGCTC	1320
Sbjct	1261	CTCTCCTTCCCTTCGGTCATCGTGGGCATCGTGGTGGGTGGCGTCCTGGTCAAGCGGCTC	1320
		L S F P S V I V G I V V G G V L V K R L	
		H L G P V G C G A L C L L G M L L C L F	
Query	1321	CACCTGGGCCCTGTGGGATGCGGTGCCCTTTGCCTGCTGGGATGCTGCTGTGCCTCTTC	1380
Sbjct	1321	CACCTGGGCCCTGTGGGATGCGGTGCCCTTTGCCTGCTGGGAATGCTGCTGTGCCTCTTC	1380
		H L G P V G C G A L C L L G M L L C L F	
		F S L P L F F I G C S S H Q I A G I T H	
Query	1381	TTCAGCCTGCCGCTCTTCTTTATCGGCTGCTCCAGCCACCAGATTGCGGGCATCACACAC	1440
Sbjct	1381	TTCAGCCTGCCGCTCTTCTTTATCGGCTGCTCCAGCCACCAGATTGCGGGCATCACACAC	1440
		F S L P L F F I G C S S H Q I A G I T H	
		Q T S A H P G L E L S P S C M E A C S C	
Query	1441	CAGACCAGTGCCACCCCTGGGCTGGAGCTGTCTCCAAGCTGCATGGAGGCCTGCTCCTGC	1500
Sbjct	1441	CAGACCAGTGCCACCCCTGGGCTGGAGCTGTCTCCAAGCTGCATGGAGGCCTGCTCCTGC	1500
		Q T S A H P G L E L S P S C M E A C S C	
		P L D G F N P V C D P S T R V E Y I T P	
Query	1501	CCATTGGACGGCTTTAACCCTGTCTGCGACCCAGCACTCGTGTGGAATACATCACACCC	1560
Sbjct	1501	CCATTGGACGGCTTTAACCCTGTCTGCGACCCAGCACTCGTGTGGAATACATCACACCC	1560
		P L D G F N P V C D P S T R V E Y I T P	
		C H A G C S S W V V Q D A L D N S Q V F	
Query	1561	TGCCACGCAGGCTGCTCAAGCTGGGTGGTCCAGGATGCTCTGGACAACAGCCAGGTTTTC	1620
Sbjct	1561	TGCCACGCAGGCTGCTCAAGCTGGGTGGTCCAGGATGCTCTGGACAACAGCCAGGTTTTC	1620
		C H A G C S S W V V Q D A L D N S Q V F	



## OATP2B1-Seq4-F

```

      Y T N C S C V V E G N P V L A G S C D S
Query 1621 TACACCAACTGCAGCTGCGTGGTGGAGGGCAACC CCGTGCTGGCAGGATCCTGCGACTCA 1680
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1621 TACACCAACTGCAGCTGCGTGGTGGAGGGCAACCCCGTGCTGGCAGGATCCTGCGACTCA 1680
      Y T N C S C V V E G N P V L A G S C D S

      T C S H L V V P F L L L V S L G S A L A
Query 1681 ACGTGCAGCCATCTGGTGGTGGCCCTTCCTGCTCCTGGTCAGCCTGGGCTCGGCCCTGGCC 1740
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1681 ACGTGCAGCCATCTGGTGGTGGCCCTTCCTGCTCCTGGTCAGCCTGGGCTCGGCCCTGGCC 1740
      T C S H L V V P F L L L V S L G S A L A

      C L T H T P S F M L I L R G V K K E D K
Query 1741 TGTCTCACCACACACCCTCCTTCATGCTCATCCTAAGAGGAGTGAAGAAAGAAGACAAG 1800
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1741 TGTCTCACCACACACCCTCCTTCATGCTCATCCTAAGAGGAGTGAAGAAAGAAGACAAG 1800
      C L T H T P S F M L I L R G V K K E D K

      T L A V G I Q F M F L R I L A W M P S P
Query 1801 ACTTTGGCTGTGGGCATCCAGTTCATGTTCTGAGGATTTTGGCCTGGATGCCCAGCCCC 1860
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1801 ACTTTGGCTGTGGGCATCCAGTTCATGTTCTGAGGATTTTGGCCTGGATGCCCAGCCCC 1860
      T L A V G I Q F M F L R I L A W M P S P

      V I H G S A I D T T C V H W A L S C G R
Query 1861 GTGATCCACGGCAGCGCCATCGACACCACCTGTGTGCACTGGGCCCTGAGCTGTGGGCGT 1920
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1861 GTGATCCACGGCAGCGCCATCGACACCACCTGTGTGCACTGGGCCCTGAGCTGTGGGCGT 1920
      V I H G S A I D T T C V H W A L S C G R

      R A V C R Y Y N N D L L R N R F I G L Q
Query 1921 CGAGCTGTCTGTCGCTACTACAATAATGACCTGCTCCGAAACCGGTTTCATCGGCCTCCAG 1980
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1921 CGAGCTGTCTGTCGCTACTACAATAATGACCTGCTCCGAAACCGGTTTCATCGGCCTCCAG 1980
      R A V C R Y Y N N D L L R N R F I G L Q

      F F F K T G S V I C F A L V L A V L R Q
Query 1981 TTCTTCTTCAAAACAGGTTCTGTGATCTGCTTCGCCTTAGTTTTGGCTGTCCTGAGGCAG 2040
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1981 TTCTTCTTCAAAACAGGTTCTGTGATCTGCTTCGCCTTAGTTTTGGCTGTCCTGAGGCAG 2040
      F F F K T G S V I C F A L V L A V L R Q

```

		OATP2B1-Seq5-F	
		Q D K E A R T K E S R S S P A V E Q Q L	
Query	2041	CAGGACAAAGAGGCAAGGACCAAGAGAGCAGATCCAGCCCTGCCCTAGAGCAGCAATTG	2100
Sbjct	2041	CAGGACAAAGAGGCAAGGACCAAGAGAGCAGATCCAGCCCTGCCCTAGAGCAGCAATTG	2100
		Q D K E A R T K E S R S S P A V E Q Q L	
		HindIII	
		L V S G P G K K P E D S R V K L R I L Q	
Query	2101	CTAGTGTCTCGGGGCCAGGGAAGAAGCCAGAGGATTCCCGAGTGAAGCTTCGAATTCTGCAG	2160
Sbjct	2101	CTAGTGTCTCGGGGCCAGGGAAGAAGCCAGAGGATTCCCGAGTGAAGCTTCGAATTCTGCAG	2160
		L V S G P G K K P E D S R V K L R I L Q	
		S T V P R A R D P P V A T M V S K G E E	
Query	2161	TCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAG	2220
Sbjct	2161	TCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAG	2220
		S T V P R A R D P P V A T M V S K G E E	
		L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K	
Query	2221	CTGTTACCGGGGTGGTGTCCCATCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAG	2280
Sbjct	2221	CTGTTACCGGGGTGGTGTCCCATCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAG	2280
		L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K	
		F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F	
Query	2281	TTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTC	2340
Sbjct	2281	TTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTC	2340
		F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F	
		I C T T G K L P V P W P T L V T T L T W	
Query	2341	ATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTGG	2400
Sbjct	2341	ATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTGG	2400
		I C T T G K L P V P W P T L V T T L T W	
		G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S	
Query	2401	GGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCC	2460
Sbjct	2401	GGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCC	2460
		G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S	

		A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y	
Query	2461	GCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC	2520
Sbjct	2461	GCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC	2520
		A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y	
		K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K	
Query	2521	AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG	2580
Sbjct	2521	AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG	2580
		K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K	
<b>ECFP-Mitte-F/R</b>			
		G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y I	
Query	2581	GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATC	2640
Sbjct	2581	GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATC	2640
		G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y I	
		S H N V Y I T A D K Q K N G I K A N F K	
Query	2641	AGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAG	2700
Sbjct	2641	AGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAG	2700
		S H N V Y I T A D K Q K N G I K A N F K	
		I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T	
Query	2701	ATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACC	2760
Sbjct	2701	ATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACC	2760
		I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T	
		P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A	
Query	2761	CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC	2820
Sbjct	2761	CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC	2820
		P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A	
		L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A	
Query	2821	CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC	2880
Sbjct	2821	CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC	2880
		L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A	

```

      A G I T L G M D E L Y K STOP
Query  2881  GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCA  2940
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct   2881  GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCA  2940
          A G I T L G M D E L Y K STOP

```

### EZS2-FIAsh-OATP2B1-ECFP

```

      Q D F K A S L C L P T T S A P A S A P S
Query   1    CAGGACTTCAAGGCTTCCCTGTGCCTGCCCACAACCTCGGCCCCAGCCTCGGCCCCCTCC  60
          ||||||||||||||||||||| ||| | || |||||||||||||||||||
Sbjct   1    CAGGACTTCAAGGCTTCCCTGTGCTGTCCCGATGCTGTGCCCCAGCCTCGGCCCCCTCC  60
          Q D F K A S L C C C P G C C A P A S A P S

```

### S2-FIAsh-OATP2B1-ECFP

```

      G I S Y I D D F A H N S N S P L Y L G I
Query   1    GGCATCTCCTACATCGATGACTTTGCCACAACAGCAACTCGCCCCTCTACCTCGGGATC  60
          ||||||||||||||||||| | || | || |||||||||||||||||||
Sbjct   1    GGCATCTCCTACATCGATGACTGTTGCCCGGCTGCTGCTCGCCCCTCTACCTCGGGATC  60
          G I S Y I D D C C C P G C C S P L Y L G I

```

### S3-FIAsh-OATP2B1-ECFP

```

      G K D S P S K Q S P G E S T K K Q D G L
Query   1    GGCAAGGACTCTCCCTCTAAGCAGAGCCCTGGGGAGTCCACGAAGAAGCAGGATGGCCTA  60
          ||||||||||||||||||| | ||||| | |||||||||||||||||||
Sbjct   1    GGCAAGGACTCTCCCTCTAAGTGTTCCTGGGTGTTGTACGAAGAAGCAGGATGGCCTA  60
          G K D S P S K C C C P G C C T K K Q D G L

```

### S4-FIAsh-OATP2B1-ECFP

```

      V G G V L V K R L H L G P V G C G A L C
Query   1    GTGGGTGGCGTCCTGGTCAAGCGGCTCCACCTGGGCCCTGTGGGATGCGGTGCCCTTTGC  60
          ||||||||||||||||||| | || | || |||||||||||||||||||
Sbjct   1    GTGGGTGGCGTCCTGGTCAAGTGTGCCCCGGGTGCTGTGTGGGATGCGGTGCCCTTTGC  60
          V G G V L V K C C C P G C C V G C G A L C

```

**EZS5-FIAsh-OATP2B1-ECFP**

```
      R V E Y I T P C H A G C S S W V V Q D A
Query 1  CGTGTGGAATACATCACACCCTGCCACGCAGGCTGCTCAAGCTGGGTGGTCCAGGATGCT 60
      |||
Sbjct 1  CGTGTGGAATACATCACACCCTGCTGCCCAGGCTGCTGCAGCTGGGTGGTCCAGGATGCT 80
      R V E Y I T P C C P G C C S W V V Q D A
```

**S5-FIAsh-OATP2B1-ECFP**

```
      S F M L I L R G V K K E D K T L A V G I
Query 1  TCCTTCATGCTCATCCTAAGAGGAGTGAAGAAAGAAGACAAGACTTTGGCTGTGGGCATC 60
      |||
Sbjct 1  TCCTTCATGCTCATCCTAAGATGTTGTCCGGGATGTTGCAAGACTTTGGCTGTGGGCATC 60
      S F M L I L R C C P G C C K T L A V G I
```